

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

**“Deteccion del simbiote *Rhodococcus rhodnii* y
otras especies relacionadas en el sistema digestivo del
Rhodnius pallescens mediante cultivo y PCR RFLP**

ANA MARIA ICAZA

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA
OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

PANAMA REPUBLICA DE PANAMA

2009



UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGIA AMBIENTAL

Título de la Tesis *Detección del simbiote y otras especies *Rhodococcus rhodni**
pallescens en el sistema digestivo del *Rhodnius pallescens* mediante cultivo y PCR
PLP

Nombre de la Estudiante Ana Maria Icaza, cedula N PE 007 251

PROBADO POR

Doctora Nora de Moreno
Presidenta

Doctora Nidia Sandoval
Miembro

Doctora Argentina Ying
Miembro

REVISADO POR

REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORIA
DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

Fecha 7 de dic 2009

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a todos mis seres queridos en especial a mi madre la Dra Susana J Icaza ya que sin su ayuda incondicional no hubiese sido posible concretar esta obra

Tambien dedico este trabajo a todos los nuevos cientificos para sigan adelante ya que cada investigacion abre el doble de puertas para seguir investigando

HOJA DE AGRADECIMIENTO

- 1 Agradezco inmensamente a la Dra Nora de Moreno por la confianza depositada en mí para conferirme este delicado tema y por ofrecerme el espacio físico para desarrollarlo
- 2 Agradezco muy profundamente al Lic Diomedes Trejos y demás compañeros del Instituto de Medicina Legal por su valioso aporte y guía para el desarrollo de las técnicas moleculares
- 3 Agradezco al Sr Jose P Espinosa por su disposición en todo momento y ayuda durante las distintas fases del desarrollo de esta tesis
- 4 Un agradecimiento especial para la Dra Susana J Icaza por inspirarme con su ejemplo para siempre seguir adelante a pesar de las adversidades
- 5 Siempre conservare un gran agradecimiento a la Dra Blanca de Hernandez por su asesoría para darle forma a este trabajo y a las Doctoras Nora de Moreno Argentina Ying y Nidia Sandoval por ser estrictas en su corrección lo que conllevó a presentar una investigación de gran calidad
- 6 Doy gracias a Dios por concederme culminar esta importante fase de mi vida y por protegerme en todo momento de peligro

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
OBJETIVOS	3
INTRODUCCION	4
MARCO TEORICO	6
A Taxonomia del genero <i>Rhodococcus</i>	6
A 1 Relación entre el género <i>Gordonia</i> y <i>Rhodococcus</i>	9
A 2 Producción de pigmento de <i>Gordonia</i>	10
A 3 Funcion de los pigmentos en las bacterias	12
B Importancia de <i>Rhodococcus</i>	13
C Identificación de <i>Rhodococcus</i>	17
C 1 Técnicas moleculares aplicadas a <i>Rhodococcus</i> y su modificación genética	20
C 1 1 Análisis de fragmentos polimorfos de restricción (RFLP)	20
C 1 2 Técnicas del ADN recombinante	23
C 1 3 Regulaciones y seguridad de insectos paratransgénicos	28
D Patogenicidad en <i>Rhodococcus</i> spp <i>Dietzia</i> <i>mans</i> y <i>Bacillus</i> <i>sphearicus</i>	29
E Diversidad de las asociaciones con simbioses	31
E 1 <i>Rhodnius pallescens</i>	31
E 2 Simbioses bacterianas	33
E 3 Tipos de simbioses	36
E 4 Otros tipos de simbiosis	37
METODOLOGIA	40
Colecta almacenaje y alimentación de <i>R. pallescens</i>	40
Almacenaje	40
Alimentación	43
Disección de <i>Rhodnius pallescens</i>	43
Cultivo en medios simples del sistema digestivo de <i>Rhodnius pallescens</i>	46
Principios procedimientos e interpretación de medios utilizados	46
Agar sangre	46
Agar <i>Rhodococcus</i>	47
Caldo BHI	48
Tinciones utilizadas	48
Kinyoun modificada	48
Gram	49
Preservación de cepas	49
Cepa control	50

Pruebas bioquímicas para <i>Rhodococcus rhodnii</i>	50
Catalasa	50
Caldo base con rojo fenol para azúcares	51
Citrato	51
SIM	52
Urea	53
Análisis molecular de <i>Rhododoccus rhodnii</i>	53
Extracción de ADN	53
PCR	57
PCR RFLP	58
RESULTADOS	60
Colección de triatominos	60
Morfología del cultivo de <i>Rhodococcus</i> spp	63
Tinción de Gram y Kinyoun modificada	67
Pruebas bioquímicas simples	70
Patrones de restricción diferencial	80
DISCUSION	91
CONCLUSION	97
RECOMENDACIONES	99
BIBLIOGRAFIA	10
ANEXO	104
Preparación de reactivos tintes y medios	104
Medios utilizados para el cultivo de <i>Rhodococcus</i>	104
Medios utilizados para la identificación presuntiva de <i>Rhodococcus</i>	105
Tinte utilizado para la identificación presuntiva de <i>Rhodococcus</i>	106
Reactivos par el análisis molecular de <i>Rhodococcus</i>	107

INDICE DE CUADROS Y FLUJOGRAMAS

CUADRO 1 Colecta de <i>Rhodnius pallescens</i> y simbiontes positivos aislados en distintas áreas de la Provincia de Panamá	61
CUADRO 2 Simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> segun sexo mantenidos en cautiverio por mas de 3 generaciones procedentes de Darién año 2008	61
CUADRO 3 Simbiontes asilados de <i>Rhodnius pallescens</i> de campo segun sexo y sitio de procedencia Provincia de Panama año 2008	62
CUADRO 4 Pigmentacion morfologia y procedencia de colonias <i>Rhodococcus rhodnii</i> y especies relacionadas de cautiverio y campo en la Provincia Panama año 2008	64
CUADRO 5 Tinción de Gram y Kinyoun modificada de <i>Rhodococcus rhodnii</i> y otros simbiontes obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> en cautiverio procedente de Darien año 2008	67
CUADRO 6 Tincion de Gram y Kinyoun modificada de simbiontes obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> silvestres procedentes de El Espino La Chorrera Provincia de Panama año 2008	67
CUADRO 7 Tinción de Gram y Kinyoun modificada de simbiontes obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> silvestres procedentes de Burunga La Chorrera Provincia de Panama año 2008	68
CUADRO 8 Tincion de Gram y Kinyoun modificada de simbiontes obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> silvestres procedentes de Carriazo Pacora Provincia de Panamá año 2008	68
CUADRO 9 Tincion de Gram y Kinyoun modificada de simbiontes obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> silvestres procedentes de Chilibre Santa Rosa Provincia de Panamá año 2008	68

CUADRO 10 Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de la Provincia del Darien y mantenidos en cautiverio por mas de 4 generaciones año 2008	70
CUADRO 11 Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de El Espino La Chorrera provincia de Panama y recogidos en su estado silvestre año 2008	77
CUADRO 12 Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de Burunga Arraiján Provincia de Panamá y recogidos en su estado silvestre año 2008	72
CUADRO 13 Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de Carriazo Pacora Provincia de Panama y recogidos en su estado silvestre año 2008	72
CUADRO 14 Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de Chilibre Santa Rosa Provincia de Panamá y recogidos en su estado silvestre año 2008	73
CUADRO15 Analisis fenotipico de simbiontes de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de la Provincia del Darién y mantenidos en cautiverio por mas de 3 generaciones año 2008	76
CUADRO 16 Analisis fenotipico de simbiontes de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de diferentes areas de la Provincia de Panama año 2008	78
CUADRO 17 Patrón de restricción diferencial cepas en cautiverio (colonia)	86
CUADRO 18 Patron de restricción diferencial cepas en libertad (campo)	88
Flujograma 1	41
Flujograma 2	44
Flujograma 3	56

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	
Comparacion de la morfologia y pigmentacion de las colonias de <i>Rhodococcus rhodnii</i> <i>Dietzia maris</i> y <i>Gordonia spp</i>	8
FIGURA 2	
Estructura molecular del canthaxanthin	10
FIGURA 3	
Canthaxanthin pigmento producido por <i>Gordonia rubripertinctus</i>	11
FIGURA 4	
Pigmentos producidos por otras especies de <i>Gordonia spp</i>	12
FIGURA 5	
Comparacion de pigmentos de <i>Gordonia spp</i> <i>Rhodococcus spp</i> <i>Staphylococcus spp</i> y <i>Corynebacterium spp</i>	13
FIGURA 6	
Molécula de Crixivan precursor del indene	15
FIGURA 7	
Pared celular de <i>Rhodococcus spp</i>	18
FIGURA 8	
PCR RFLP de <i>Rhodococcus rhodnii</i>	21
FIGURA 9	
Transformación de una bacteria huésped	24
FIGURA 10	
Vector M13 y sus sitios de clonacion	25
FIGURA 11	
Expresión genetica de la cecropin A	28
FIGURA 12	
<i>Rhodnius pallescens</i>	31
FIGURA 13	
<i>Palma Attalea butyracea</i>	32

FIGURA 14	
Parte del intestino donde se forma el <i>T. cruzi</i>	34
FIGURA 15	
<i>T. cruzi</i> tenido con Giemsa	35
FIGURA 16	
Chinche de hojas (afido)	38
FIGURA 17	
Bacteriocito conteniendo <i>Buchnera</i>	38
FIGURA 18	
Moscas blancas	39
FIGURA 19	
Halo digestivo de <i>Corynebacterium spp</i>	65
FIGURA 20	
Colonias de <i>Rhodococcus rhodnii</i> sobre agar Rhodococcus	65
FIGURA 21	
Color y aspecto de <i>Rhodococcus rohdnii</i> en agar sangre	65
FIGURA 22	
Colonia de <i>Dietzia maris</i> en agar sangre	65
FIGURA 23	
Colonias de <i>Gordonia spp</i> sobre agar Rhodococcus	66
FIGURA 24	
Colonia de <i>Gordonia rubripertinctus</i> en agar Rhodococcus	66
FIGURA 25	
<i>Bacillus sphearicus</i> sobre agar Rhodococcus	66
FIGURA 26	
<i>Staphylococcus aureus</i> sobre agar Rhodococcus	66
FIGURA 27	
Gram de colonia joven de <i>Rhodococcus rhodnii</i>	69
FIGURA 28	
Gram de <i>Rhodococcus rhodnii</i> fase estacionaria	69
FIGURA 29	

Gram de <i>Rhodococcus rhodnii</i> final de fase estacionaria	69
FIGURA 30 Directo en heces de <i>Rhodnius pallescens</i>	69
FIGURA 31 Pruebas bioquímicas simples en cepa Carriazo 43	74
FIGURA 32 Pruebas bioquímicas simples en cepa Carriazo 45	74
FIGURA 33 Pruebas bioquímicas en cepa Burunga 23	74
FIGURA 34 Pruebas bioquímicas en cepa Carriazo 58	74
FIGURA 35 Pruebas bioquímicas en la cepa control	74
FIGURA 36 PCR RFLP de <i>Dietzia maris</i>	81
FIGURA 37 PCR RFLP de <i>Gordonia rubripertinctus</i>	81
FIGURA 38 PCR RFLP de <i>Gordonia spp</i>	81
FIGURA 39 PCR RFLP de <i>Gordonia spp</i>	82
FIGURA 40 PCR RFLP de <i>Gordonia spp</i>	82
FIGURA 41 PCR RFLP de <i>Rhodococcus rhodnii</i> var1	83
FIGURA 42 PCR RFLP de Cepa control	83
FIGURA 43 PCR RFLP de <i>Rhodococcus rhodnii</i> var2	83
FIGURA 44 PCR RFLP de <i>Corynebacterium spp</i>	84
FIGURA 45 PCR RFLP de <i>Corynebacterium spp</i>	84

FIGURA 46	
Extraccion de ADN Método <i>Rhodococcus</i>	85
FIGURA 47	
Extracción de ADN Método <i>Nocardia</i>	85

RESUMEN

Rhodococcus rhodnii es considerado por varios investigadores como un simbiote obligatorio de *Rhodnius prolixus* ya que aparentemente las ninfas no pueden llevar a cabo su desarrollo sexual sin las vitaminas que le confiere su relación simbiótica con *Rhodococcus rhodnii* (Baines 1956 Beard 1992)

Segun Hill (1976) *Rhodnius prolixus* adquiere simbriones a traves de la coprofagia de las heces de los adultos para poder pasar de un estadio a otro Sin embargo se ha encontrado en este estudio que en *Rhodnius pallescens* además del género *Rhodococcus* puede haber otros simbriones comensales como *Gordonia spp* *Dietzia maris* o *Corynebacterium spp* los que posiblemente le estén confiriendo algun factor necesario para su desarrollo

La importancia de estos simbriones radica en que pueden ser utilizados como control biologico para evitar la transmisión de *Trypanosoma cruzi* el cual se desarrolla en el intestino medio en donde se encuentran estos simbriones Mediante una modificacion genetica los simbriones pueden actuar como antiparasiticos que conlleven a evitar su desarrollo en este hospedero intermediario (Durvasula 1997 Pavia 2005) Los estudios con *Rhodococcus spp* son de gran interés debido a la posibilidad de disenar estrategias paratransgénicas y es por ello que se requieren desarrollar tecnicas para su identificación y además establecer su prevalencia en nuestro medio

La identificación de *Rhodococcus spp* a través de pruebas bioquímicas es una tarea laboriosa. Los azúcares pueden ser utilizados como una guía de tendencias para la identificación presuntiva de *Rhodococcus spp* pero no definitiva. Por ello, en este trabajo se presentan pruebas bioquímicas como lo es la urea y la glucosa, además de la tinción modificada de Kinyoun como elementos claves para construir un perfil de identificación presuntivo.

El desarrollo de un medio de cultivo adecuado como el medio *Rhodococcus* permitió a la bacteria desarrollar una coloración y morfología de colonia que facilita su recuperación.

En esta investigación no solo se verificó que *Rhodococcus rhodnii* se encuentra en nuestro vector sino que se detectaron otros simbiontes como *Gordonia spp*, *Dietzia spp* y *Corynebacterium spp* mediante la técnica de PCR RFLP, la cual permitió establecer patrones de restricción característicos para la identificación final de estos microorganismos.

Se ha encontrado que el índice de infestación del *Trypanosoma cruzi* constituye un 98% de las cepas de campo encontradas en este estudio, por lo que es de suma importancia establecer una medida eficaz que ayude a evitar la transmisión del parásito.

OBJETIVOS

a) Objetivo General

- 1 Determinar la presencia del simbiote *Rhodococcus rhodnii* y especies relacionadas en *Rhodnius pallescens* mediante cultivo confirmando su identificación en PCR RFLP y detectar al *Trypanosoma cruzi* en los vectores de campo

b) Objetivos específicos

- 1 Determinar la prevalencia de *Rhodococcus rhodnii* en *Rhodnius pallescens*
- 2 Determinar el porcentaje de infección de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius pallescens* de campo
- 3 Identificar presuntivamente a *Rhodococcus* a través de morfología en cultivo y pruebas bioquímicas
- 4 Diferenciar a *Rhodococcus rhodnii* de otras especies de *Rhodococcus* mediante la prueba molecular PCR RFLP

INTRODUCCION

La relacion simbiótica entre microorganismos e insectos es muy conocida esta pueden encontrarse en los intestinos o en otras partes del cuerpo como tejidos y la hemolinfa ovarios y otros organos sexuales (Hypsa y Dale 1997) Los microorganismos encontrados en insectos son usualmente intracelulares y muchas veces es difícil cultivarlos en medios artificiales No es el caso de *Rhodococcus prolixus* el cual puede crecer en medios simples Su relacion simbiotica con los triatominos es de vital importancia en el desarrollo sexual de *Rhodnius* ya que le confiere vitaminas necesarias para el crecimiento como vitamina B (Baines 1956)

Rhodococcus esta presente normalmente en el suelo y en las excretas de muchos animales *Rhodococcus rhodnii* es adquirido por los triatominos a traves de la coprofagia que las ninfas realizan al emerger para poder pasar al siguiente estado de maduracion Esta necesidad obligatoria ha sido objeto de estudios ya que por muchos años se ha intentado controlar al triatomino para evitar la transmision de los tripanosomas (Beard 1998) Es por ello que actualmente se estan explorando otras vias para el control de estos insectos y se ha pensado en *Rhodococcus rhodnii* el cual es un elemento obligatorio para el desarrollo de *Rhodnius prolixus* Los simbiositos pueden ser modificados genéticamente y utilizarse como antiparasiticos dentro del intestino medio que es donde se desarrollan los tripanosomas (Dotson 2003)

En este estudio se pretende aislar el simbiote *Rhodococcus rhodnii* de *Rhodnius pallescens* el cual es tiene una distribución desde Colombia hasta Nicaragua desarrollar un medio para su aislamiento de manera que nos presente una morfología y coloración de colonia característica para luego identificar sus especies mediante la prueba de PCR RFLP a través de 5 diferentes enzimas de restricción para crear un patrón diferencial único de *Rhodococcus rhodnii*

Se desea averiguar que pruebas bioquímicas nos conlleven a una identificación presuntiva además de probar diferentes tinciones que ayuden a clasificar a *Rhodococcus spp* como un microorganismo ácido resistente débil

Importante también es determinar el índice de infestación del *Trypanosoma cruzi* con respecto a la presencia de *Rhodococcus rhodnii* por lo que se realizara una placa directa de heces de los *Rhodnius pallescens*

Se espera entonces obtener información sobre la prevalencia de *Rhodococcus rhodnii* en *Rhodnius pallescens* y si este simbiote u otros simbioses recuperados podrían utilizarse para el control del vector en Panamá ya que hasta el momento su presencia solo se había encontrado en *Rhodnius prolixus*

MARCO TEORICO

A Taxonomía de genero *Rhodococcus*

El nombre del género *Rhodococcus* fue utilizado por primera vez por Zopf en 1891 revivido y redefinido en 1977 para acomodar al complejo *Rhodochrous* que comprendia un numero de especies que se asemejaban pero no pertenecian al Género *Nocardia* *Corynebacterium* y *Mycobacterium*

En los ultimos años se han observado cambios considerables a la clasificacion del genero Desde la publicacion del Manual de Bergey s de Bacteriologia Sistemática que lista a 20 especies algunas especies se han combinado transferido a otros generos reclasificados en nuevos generos y descrito nuevas especies

Existen cepas que se han clasificado como *Arthobacter picolinophilus* *Corynebacterium hoagii* *Nocardia restricta* y *Nocardia calcarea* y que despues de un análisis taxonómico profundo se ha establecido que son especies de *Rhodococcus* *Nocardia corynebacteriodes* tambien aparece como parte del genero *Rhodococcus* pero no se le ha denominado a ninguna especie válida Otros nombres de especies invalidos son *Rhodococcus longus* y *Rhodococcus luganensis* Hay muchas cepas que no han sido identificadas a nivel de especie *Rhodococcus obuensis* es sinónimo de *Rhodococcus sputi* siendo el primer nombre obsoleto Dos nuevos géneros se han reubicado para acomodar organismos previamente establecidos como *Rhodococcus* *R auranticus* se

transfirió al género *Tsukamurella* mientras que *R. bronchialis*, *R. rubripertincta*, *R. sputi* y *R. terreus* fueron transferidos al género *Gordonia* (Bell et al 1998)

Actualmente hay 16 especies de *Rhodococcus* establecidas: *R. coprophilus*, *R. equi*, *R. fascinus*, *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. rhodni*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*, *R. zopfii*, *R. asteroides*, *R. marinonascens*, *R. percolatus*, *R. opacus*, *R. wratislaviensis*, *R. koreensis* tipo 1 y *R. koreensis* tipo 2 (Goodfellow et al 2002)

Rhodococcus maris era conocido originalmente como *Flavobacterium maris* pero más tarde fue clasificado como miembro del género *Rhodococcus*. La razón de la reclasificación fue la presencia de ciertas características quimiotaxonómicas del género *Rhodococcus* como células Gram positivas, ausencia de micelio aéreo, pared celular química tipo IV, ácidos micólicos MK 8(H₂) como principal isopropanol, ácidos grasos que incluyen una cadena saturada y monosaturada y ácido tuberculoesteárico. Sin embargo, no fue sino hasta recientemente que se descubrió una característica química que diferencia a esta cepa de tal manera que se coloca en un género separado, el Género *Dietzia*, en honor a Alma Dietz, una microbióloga norteamericana. La ausencia de fosfatidil inositol y fosfatidil linositol manósido por parte de *Rhodococcus maris* lo reclasifica en el género *Dietzia maris*. Este género solo tiene dos integrantes: *D. maris* y *D. natronolimnaios* (Rainey et al 1995).



Rhodococcus rhodnii

Dietzia maris

Gordonia spp.

Fig. 1 Comparación de la morfología y la pigmentación de las colonias. Ejemplo de una estandarización de medio de cultivo: desarrollo de una característica importante de la colonia: su pigmentación.

En los estudios taxonómicos es de suma importancia estandarizar la preparación del agar; ya que influye directamente en el desarrollo de ciertas características de la colonia; tales como coloración del substrato ó micelio aéreo y la difusión del pigmento dentro del medio. Idealmente el agar debe solidificar el medio de cultivo, no debe contener sustancias que promuevan o inhiban el crecimiento ó afecten la morfología de la bacteria. El agar procede de diferentes tipos de algas como *Gelidium amansii* y *Gracilaria confervoides*. Es obvio que las propiedades del agar pueden variar según el tipo de alga y el método de preparación. Una de las maneras de evitar tanta variación, es cultivar las algas para evitar impurezas. Como el agar está compuesto de una galactosa lineal, se hace muy difícil de purificar ese polímero, de manera que un agar crudo ofrece un desarrollo inestable a los Actinomyces. Los agares favorables para los Actinomyces poseen metales como M_g , M_n , F_e , y Z_n , ya que permite un buen crecimiento y desarrollo de sus características. (Okami, Arima y Suzuki, 1963)

A 1 Relación entre el género *Gordonia* y *Rhodococcus*

Tsukamura propuso en 1971 el género *Gordonia* y los miembros de este género se distinguen de las *Micobacterias* por ser alcohol ácido débiles y por la ausencia de arilsulfatasa del género *Nocardia* por su habilidad para reducir nitrato y por la ausencia de micelio. Seis años después Goodfellow y Alderson 1979 transfirieron el complejo rhodochrous incluyendo a representantes del género *Gordonia* al género *Rhodococcus*. Sin embargo estudios del ácido micólico y menaquinone revelaron variaciones heterogéneas dentro del género *Rhodococcus* (Tsukamura 1971).

Los ácidos micólicos son unos ácidos grasos β hidróxidos de alto peso molecular que forman parte de la pared celular de los ácidos resistentes como *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Mycobacterium*. Los ácidos micólicos de *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Mycobacterium* tienen una cadena de carbonos de una longitud aproximada de C₃₂, C₅₀ y C₈₀ respectivamente. Sin embargo para las especies de *Rhodococcus* se ha encontrado una considerable variación en la longitud de las cadenas de carbono que oscilan en un rango de C₃₄ a C₅₀. Los organismos ubicados dentro del género *Gordonia* tienen cadenas de ácidos micólicos ligeramente más largas que van en un rango de C₅₂ a C₆₆ y parecen estar muy estrechamente relacionadas a especies de *Nocardia*. Esto se ha podido determinar gracias a la técnica de cromatografía líquida de alto nivel (HPLC) y el análisis de ésteres de p bromofenacil de los ácidos micólicos (Butler, Kilburn y Kubica 1987). La técnica no se ha

aplicado con la especie de *R. rhodnii* específicamente sin embargo se han diferenciado otras especies como *R. equi*, *R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. terrae*, *R. rubropertinctus*, *R. corallinus*, *R. bronchialis* y *R. sputi*.

Stackebrandt mediante análisis de 16rRNA revivió el género *Gordonia* y especies que habían sido clasificadas dentro del género *Rhodococcus* y que habían pertenecido al género *Gordonia* fueron devueltas a su género de origen como *Gordonia bronchialis*, *Gordonia rubropertinctus* y *Gordonia terrae*. En 1997 el nombre correcto del género fue cambiado a *Gordonia* (Stackebrandt 1997).

Actualmente se han reconocido 19 especies de *Gordonia* cuyos ácidos micólicos varían de 48 a 66 carbonos y tienen 9 unidades de isopreno como su menaquinona predominante (Arenskötter 2004).

A 2 Producción de pigmento de *Gordonia*

La bacteria *Gordonia jacobea* sintetiza y acumula grandes cantidades de canthaxanthin, un pigmento que es muy similar al β -caroteno, solamente varía en dos dobles enlaces de oxígeno.

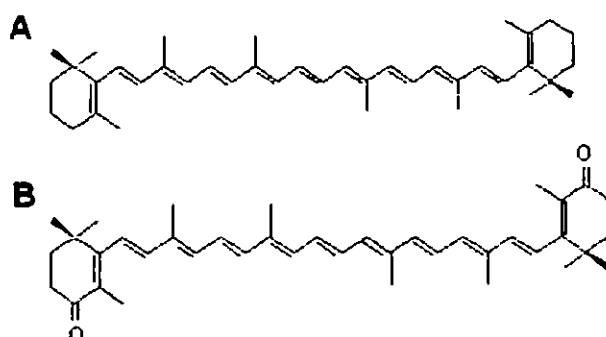


Fig 2 Estructura molecular del canthaxanthin A) β -caroteno y B) canthaxanthin (Patricia Veiga Crespo 2005)

Este pigmento es muy utilizado en la industria de alimentos y cosméticos. La canthaxanthin es un keto-caroteno cuya producción puede ser influenciada por las condiciones de crecimiento y la composición del medio. El medio de cultivo debe poseer algún precursor de la ruta gliceraldeído fosfato piruvato, como lo es el isoprenil pirofosfato (IPP).



Fig. 3 Canthaxanthin, pigmento producido por *Gordonia rubripertinctus*.

Para que la producción del pigmento alcance su máximo punto, el microorganismo debe encontrarse en su fase estacionaria de crecimiento. Se ha comprobado que si el medio de cultivo posee 1% de glucosa y 5% de soya se puede alcanzar una producción de canthaxanthina de 13,373 ug/ml, mientras que si se utiliza 2% de glucosa y 1% de soya se alcanza solamente 1,000 ug/ml. (Veiga-Crespo, 2005)

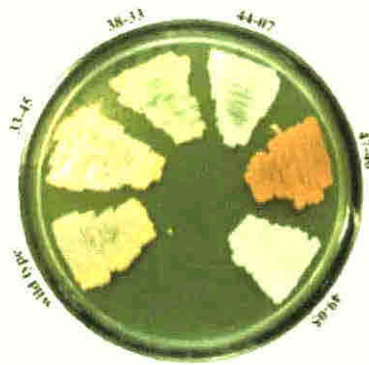


Fig. 4 Pigmentos producidos por otras especies de *Gordonia spp.* (Arenskötter, 2004)

A.3 Función de los pigmentos en las bacterias

La producción de pigmentos en bacterias tiene diversas funciones: Los carotenoides, además de tener una función fotosintética, presentan una función protectora frente a la radiación ultravioleta y luz visible y protegen a estos microorganismos contra los efectos tóxicos del oxígeno.

Muchas colonias bacterianas llaman la atención por su característica coloración, ya sea, por la excreción de un colorante al medio ó por la pigmentación de las células. La capacidad de sintetizar sustancias coloreadas está determinada genéticamente y es por tanto una característica de la especie microbiana en particular.

En *Chromobacterium violaceum* se encuentra la violaceína, un pigmento que puede ser utilizado como una potencial droga para el tratamiento de la enfermedad del Chagas. (Puente, 2007)

Sería interesante descubrir si el pigmento producido por *Gordonia spp.* ó *Rhodococcus spp.* poseen alguna función citolítica.



Fig. 5 Comparación de pigmentos de *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*

B. Importancia de *Rhodococcus* spp.

Rhodococcus se ha aislado de diferentes fuentes tales como suelo, piedra, agua subterránea de pozo, estiércol de animales, sedimentos marinos, intestino de insectos y plantas.

Rhodococcus es capaz de transformar y degradar varios químicos que lo hacen útil en biotecnología ambiental e industrial. También sintetiza surfactantes, amidas y polímeros. Actualmente se encuentran registradas 80 patentes en el "World Patent Index". A través de manipulación genética se han transferido genes entre especies de *Rhodococcus* y *E. coli* para crear cepas de utilidad en biotecnología. (Bell *et al.*, 1998)

Las especies de *Rhodococcus erythropolis*, *R. ruber* y *R. percolatus* son productoras de surfactantes que ayudan en la degradación de sustancias hidrofóbicas. Los surfactantes producidos por *Rhodococcus* son más efectivos y menos tóxicos que muchos surfactantes sintéticos actualmente existentes. He aquí, la

importancia de los ácidos micólicos ya que facilitan la asimilación de compuestos hidrofóbicos (McLeod 2006)

Rhodococcus spp también puede ser utilizado para la desulfuración del petróleo pudiendo prevenir la lluvia ácida. Una característica única de estas especies es que puede desulfurar el petróleo sin afectar su valor calorífico. Algunas cepas incluso pueden crecer utilizando hidrocarbonatos como propano, butano y acetileno como fuente única de alimento. La detección y cuantificación de *Rhodococcus* en aguas subterráneas puede ser la clave para el hallazgo de depósitos de aceites (Van der Geize y Dijkhuizen 2004)

Rhodococcus metaboliza sustratos aromáticos oxigenando primero el anillo aromático para formar un diol (2 grupos de alcohol). El anillo se rompe con mecanismos intradióles y exponiendo el sustrato a otro metabolismo. Bajo este mecanismo, la creación de los dioles es bien predecible, haciendo posible la creación de compuestos sintéticos. Estos procesos pueden utilizarse en los casos donde la síntesis química directa no es posible o poco eficiente. Por ejemplo, *Rhodococcus* produce indeno, un precursor del crivianTM utilizado para el tratamiento de HIV. Es un inhibidor de proteasa y contiene 2 de los 5 centros quirales que se necesitan para la creación del compuesto (Treadway *et al* 1999)

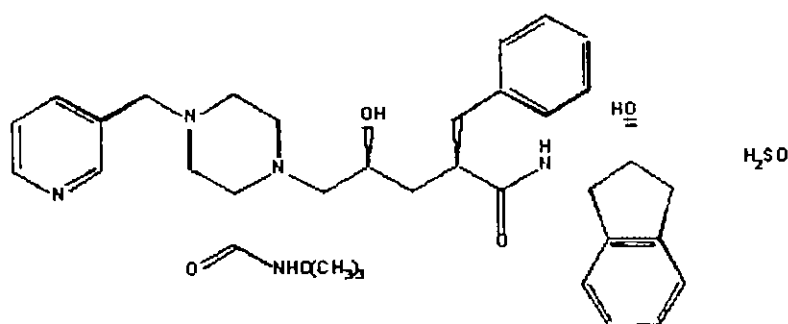


Fig 6 Molécula de Crixivan el precursor indene se muestra en verde y es producido por *Rhodococcus* (Treadway et al 1999)

Se ha propuesto utilizar a *Rhodococcus coprophilus* como indicador fecal de contaminación ya que se ha aislado repetitivamente del estiércol de los animales. *Rhodococcus rhodochrous* es utilizado por una industria japonesa para la producción de 30 000 toneladas de acrilamida al año. Las investigaciones han continuado para aplicar la nitrilasas para la producción de varias amidas incluyendo nicotinamida y ácido p-aminobenceno además de agentes antimicrobianos como ácido isonicotínico, hidrazida y pirazinamida.

Algunas células de *Rhodococcus* son hidrofóbicas debido a las cadenas alifáticas de los ácidos micólicos de la pared celular. Esta característica puede ayudar a la degradación de contaminantes hidrofóbicos permitiendo que las células se adhieran al aceite o a la interfase de agua.

Otras cepas son psicrófilas, lo que puede ser importante para la biorremediación en climas fríos. Ciertas sustancias químicas que son contaminantes pueden ser degradadas por especies de

Rhodococcus los fenoles clorinados tintes azosulfonados y pesticidas como el metamitron s triazines y n metil carbamates (Bell *et al* 1998)

Se han realizado estudios de genotipificación de una cepa de *Rhodococcus sp RHA1* y se encontro que posee 4 replicones incluyendo 3 grandes plásmidos lineares Estos replicones son invertrones tipicos de los Actinomycetes Se ha propuesto que los plásmidos lineares evolucionaron de los bacteriófagos y que los cromosomas lineares surgieron de la recombinación de plásmidos lineares con cromosomas circulares *Rhodococcus spp* por ello pueden ser utiles para los estudios ecologicos de los Actinomycetes ya que su ciclo de desarrollo es mas simple que el de los *Streptomyces* y crece más rapido que *M tuberculosis*

Los *Streptomyces* contienen cromosomas lineares Los Actinomycetes más relacionados con la cepa RHA1 poseen cromosomas circulares a pesar de que contienen plasmidos que se linearizan frecuentemente en la naturaleza lo que es consistente con interconversion entre las formas lineares y circulares en el laboratorio

El genoma de la cepa RHA1 tiene 890 proteínas que han sido identificadas y asociadas con el transporte Contiene además rutas para degradar muchos tipos de mono y disacaridos Cabe senalar que posee varias vias metabolicas para degradar la glucosa entre ellos Emden Meyerhoff Parnas la ruta de Entner doudoroff y la ruta de la pentosa fosfato El analisis proteómico de la cepa RHA1 fue

comparado con otras especies afines obteniendo el siguiente porcentaje de similitud *Nocardia farcinica* IFM10152 43 3% *M tuberculosis* H37Rv 35 3% *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 30 9% *Streptomyces coelicolor* A3 29 3% y *Frankia* sp EAN1pec 23 3% (McLeod 2006)

C Identificación de *Rhodococcus*

La identificación a nivel de género se puede realizar en base a características químicas y el análisis de los componentes de la pared celular a través de varias técnicas cromatográficas combinadas con la observación del crecimiento nocardiforme. Sin embargo no existe ningún análisis químico o morfológico que separe claramente todas las especies de *Rhodococcus* de otras formas nocardiformes que contengan ácidos micólicos.

Los *Rhodococcus* tienen una pared química tipo IV lo que significa que el único ácido diamino en el peptidoglicano es el ácido meso diaminopimélico y sus azúcares principales son arabinosa y galactosa. *Rhodococcus* puede ser diferenciado dentro del grupo CMN (*Corynebacterium*, *Micobacterium* y *Nocardia*) por poseer ácido tuberculostearico, ácidos micólicos entre 34 y 64 átomos, menaquinonas deshidrogenadas con 8 unidades de isopreno pero sin el elemento cíclico que es característico de *Nocardia* (Klatte et al 1994).

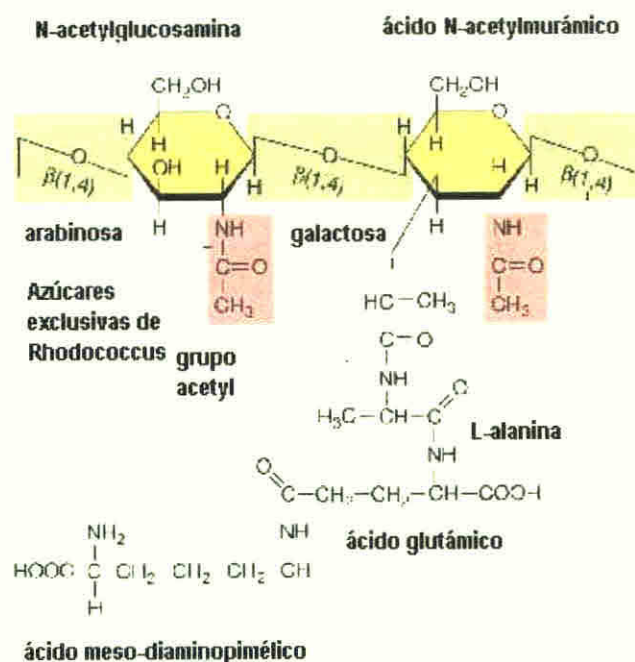


Fig. 7 Pared celular de *Rhodococcus* (Imagen modificada de Bailey y Scott, 1998)

La identificación de *Rhodococcus* a través de pruebas bioquímicas es una tarea laboriosa. El API Coryne System (Biomerieux) incluye a *Rhodococcus equi*, pero se han encontrado que en algunos casos este sistema identifica incorrectamente cepas de *Rhodococcus rhodochrous* como *Rhodococcus equi*. (Soto *et.al.* 1994)

El sistema Biolog se ha utilizado para identificar *Rhodococcus*, pero aún no se ha comprobado que tan confiable es este sistema. Este sistema diferencia bacterias sobre la base de oxidación de 95 fuentes de carbono. El sistema Omnilog (analizador) usa el método de utilización de sustratos de carbono basado en 96 reacciones de 6 a 8 clases de sustrato de carbono, lo que produce una huella con un patrón característico.

Debido a esto se desarrollo un sistema computarizado con HPLC para analizar los perfiles de los acidos micólicos Exitosamente se diferencio las especies de *Mycobacterium* de otras especies de *Rhodococcus* sin embargo un estudio anterior con HPLC para identificar nocardiformes no produjo patrones aceptables para todas las especies (Glickman *et al* 1994)

Analisis de los esterios de ácidos grasos metílicos por cromatografia ha probado ser util para estudios taxonomicos Sin embargo diferentes especies de *Rhodococcus* tienen diferentes patrones solamente se tomó el patrón promedio para determinar una especie Por lo tanto aun no es claro cuan consistentes son estos patrones

Rhodococcus puede ser identificado por pirolisis de la célula con un subsecuente análisis espectrofotométrico Esta tecnica se ha aplicado satisfactoriamente para la identificación de las formas nocardiformes que contienen acidos micólicos Sin embargo muy pocos laboratorios tienen el equipo necesario para realizar este procedimiento Las pruebas serológicas tienen una limitacion con respecto a la especificidad y al uso de animales experimentales (Klatte *et al* 1994)

El estudio de *Rhodococcus* es de gran interes debido a la posibilidad de disenar estrategias paratransgénicas Para ello se crean bacterias recombinantes que expresan productos que controlan el desarrollo del parasito dentro del vector de manera que las bacterias son transformadas con genes tales como los

codificantes para péptidos antimicrobianos como las cecropinas que posteriormente son tomadas por los insectos a través de su alimentación

Se ha estandarizado una PCR seguida de un ensayo de longitud de polimorfismo de fragmentos de restricción (PCR RFLP) basada en los genes codificantes para el ARN ribosomal 16s para la identificación de *Rhodococcus rhodnii* aislado de *Rhodnius prolixus*. Para lograrlo se comparó el número y tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos *in vitro* con los deducidos a partir del análisis de restricción *in silico* de la secuenciación del fragmento amplificado al gen codificante para el ARNr (Rodríguez Pavia y Calderón 2004)

C 1 Técnicas moleculares aplicadas a *Rhodococcus* y su modificación genética

C 1 1 Análisis de fragmentos polimorfos de restricción (RFLP)

Las interrelaciones entre cepas microbianas de varios tipos de hábitats pueden estudiarse analizando su DNA para obtener su huella genética. Este método implica la secuenciación del DNA y la conformación de secuencias de nucleótidos en genes comparables la cual se utiliza para detectar las relaciones filogenéticas.

El DNA también puede examinarse mediante digestión de enzimas de restricción comparando los patrones de los fragmentos resultantes y examinando las secuencias repetitivas en el DNA. Los patrones de bandas de RFLP para diferentes cepas se emplean para

calcular la divergencia genética y construir árboles filogenéticos, lo cual permite el estudio de las relaciones entre cepas. (Ronald y Richard, 1993)

El análisis de fragmentos polimorfos de restricción (RFLP) consiste primero en extraer un DNA total de una colonia pura. El DNA extraído es cortado en fragmentos más pequeños utilizando las enzimas de restricción. Estas son endonucleasas que reconocen secuencias específicas de DNA y usualmente tienen un largo de 4-6 pares de bases (pb).

Los fragmentos de DNA son usualmente separados mediante un gel de electroforesis y visualizado con bromuro de etidio con una lámpara de luz ultravioleta.

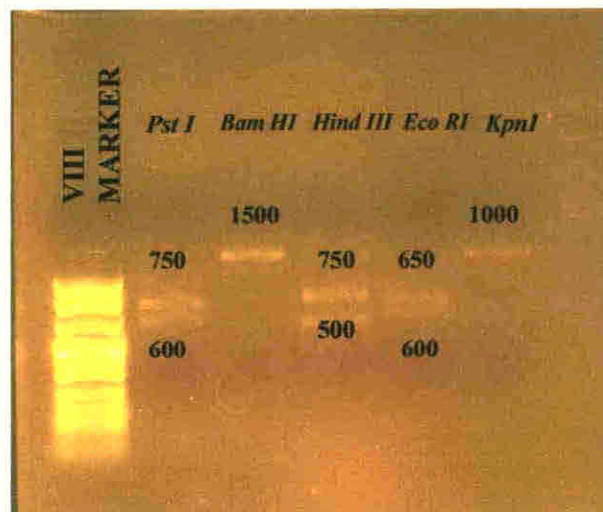


Fig. 8 PCR-RFLP de *Rhodococcus rhodnii* var2

Muchas veces ocurren cambios de bases como resultado de una inserción, delección ó substitución lo que produce una variación

de los sitios de restricción lo que provoca leves diferencias entre bacterias muy relacionadas genéticamente

Las bacterias que están relacionadas de forma muy distante van a tener muchos sitios de restricción diferentes. A estos cambios se les llama polimorfismos.

La digestión de un genoma bacteriano posee cientos de fragmentos de diferentes tamaños. A veces el patrón observado es fotografiado y utilizado como huella digital. A menudo es difícil de interpretar un gran número de fragmentos de restricción y en muchos casos hay fragmentos que se observan como una mancha. La solución está en transferir a una membrana ya que solo los fragmentos que contienen una secuencia específica pueden detectarse utilizando una sonda genética ya que dos cepas de la misma especie producen patrones diferentes (Maier, Pepper y Gerba 2000).

Los estudios epidemiológicos también pueden basarse en el examen de los patrones RFLP de muestras clínicas y ambientales. Zimmerman *et al* (1994) al estudiar la causa de un brote epidémico de coccidiomycosis en California en 1992, encontraron que la mayoría de los aislados procedentes de California y de Venezuela tenían un patrón de RFLP idéntico, mientras que algunos aislados procedentes de un hospital situado en el Valle de San Joaquín presentaban un patrón de RFLP diferente. Esto indicaba que la mayoría de las cepas estudiadas procedían de una misma fuente mediante una conexión en la cadena de transmisión, pero unas

pocas cepas de una localidad determinada tenían un origen totalmente diferente (Ronald y Richard 1993)

C 1 2 Técnicas del ADN recombinante

La clonación de un DNA ha sido muy utilizada en microbiología ambiental para examinar la estructura genética de las poblaciones bacterianas. Permite encontrar nuevos o muy relacionados genes así como caracterizar e identificar cepas no cultivables. Un clon es un fragmento de DNA foráneo que se replica dentro de un organismo después de haber sido introducido por un vector de clonación como un plásmido.

Un buen vector de clonación debe tener 3 propiedades muy importantes: debe ser capaz de replicarse, debe poder introducir el DNA foráneo dentro de una célula y debe poder detectarse su presencia (Maier, Pepper y Gerba 2000).

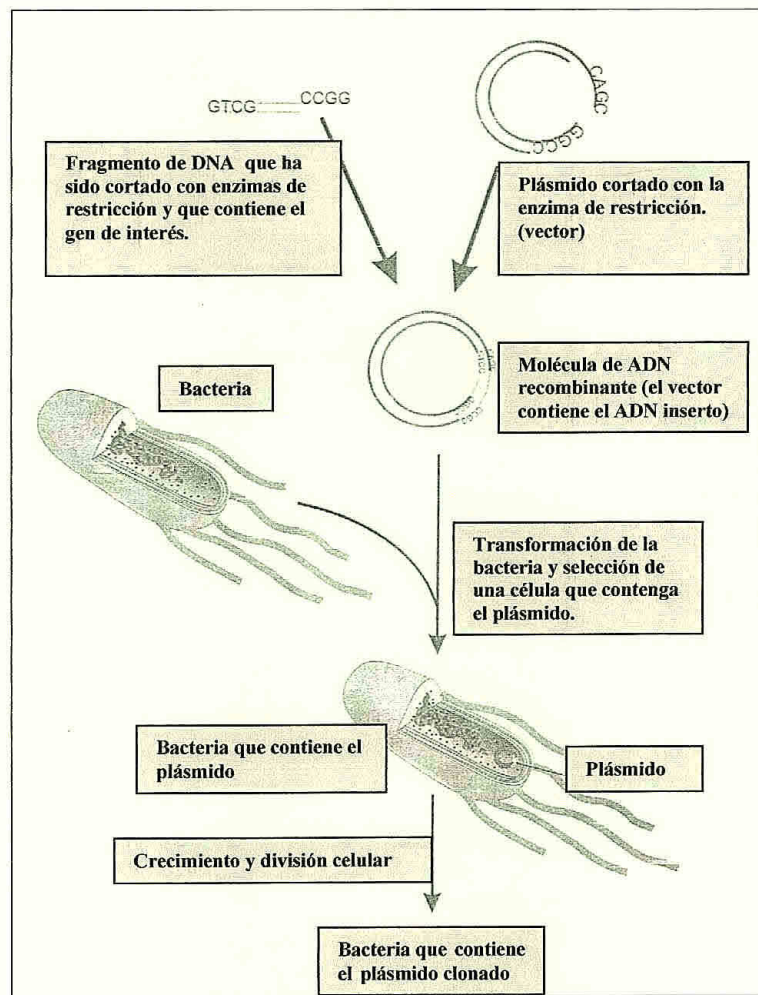


Fig. 9 Una parte de DNA foránea es insertada dentro de un plásmido ó vector. El vector puede entonces transformar a la bacteria huésped; el cual va crecer y desarrollarse. Subsecuentemente, toda la progenie de la bacteria tendrá el DNA foráneo. Dentro del plásmido existe una región llamada sitio múltiple de clonación, que es una secuencia corta que ha sido construida con múltiples cortes realizados por enzimas de restricción. (Maier, Pepper y Gerba, 2000)

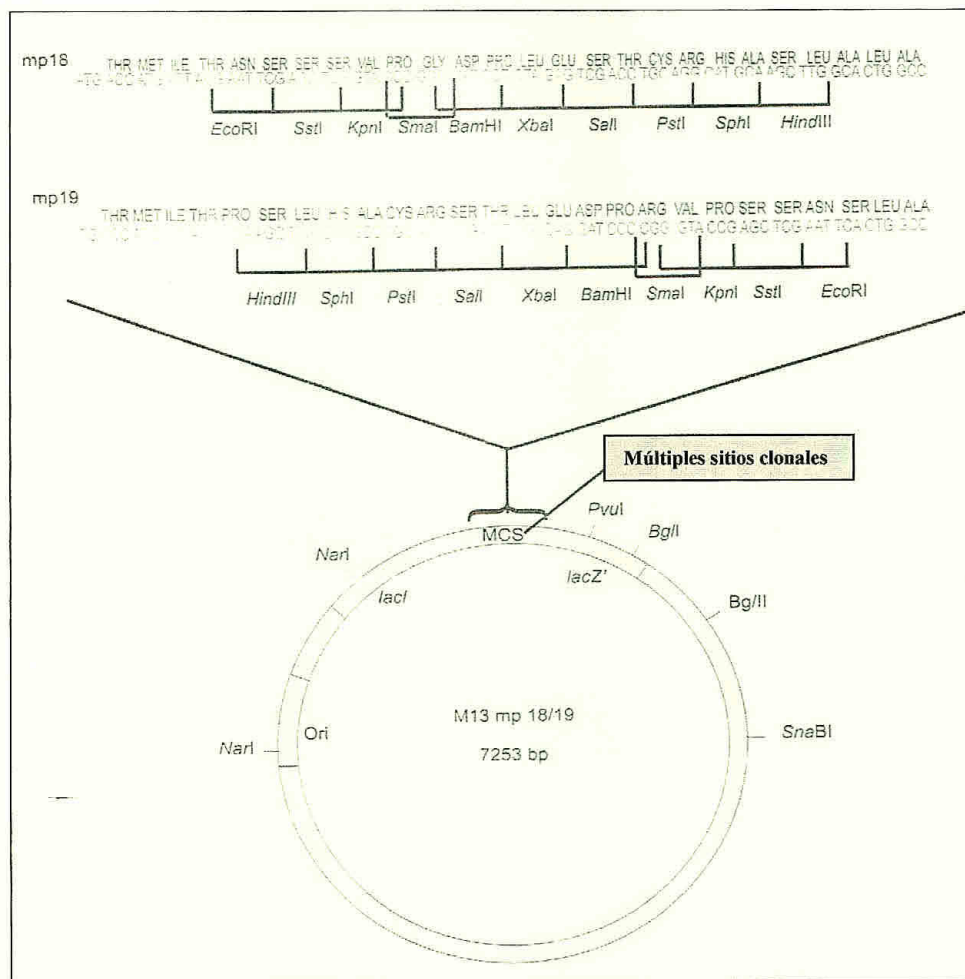


Fig. 10 El vector M13. Este vector muestra múltiples sitios de clonación. Sólo las enzimas de restricción que cortan el vector en un sitio único se muestran en el mapa de restricción. (Maier, Pepper y Gerba, 2000)

Un producto de PCR puede ser insertado directamente dentro de un vector de clonación y replicado dentro de un huésped. Este producto resulta en una secuencia de análisis mucho más limpia que un producto de PCR que es directamente secuenciado sin antes ser clonado previamente. (Maier, Pepper y Gerba, 2000)

Para *Rhodococcus*, un plásmido selecto para la resistencia del antibiótico thiostrepton es expresado por simbioses transgénicos dentro del intestino de insectos colonizados experimentalmente.

Los insectos se pueden alimentar de sangre que contiene thioestrepton y la bacteria es capaz de sobrevivir y persistir a través del desarrollo del insecto (Doston Durvasula y Beard 1998)

Si se esterilizan la superficie de los huevos de los triatominos con solucion yodada y luego se colonizan con los simbioses genéticamente transformados se puede desarrollar una linea de artrópodos paratransgénicos que son refractarios a la infección con *T. cruzi*. El péptido L Cecropin A es expresado por el plasmido utilizado para la transformacion genética de *R. rhodni* (Beard Durvasula y Richards 1998). Las bacterias simbióticas de *R. prolixus* son potencialmente valiosas como vehiculos para la introduccion de genes foraneos estables con el proposito de eventualmente alterar la habilidad del insecto de transmitir agente patogenos (Beard 1992)

Para que un gen refractario sea efectivo tiene que ser fijo de manera tal que logre reemplazar completamente al vector silvestre. Un buen sistema para dispersar un gen refractario a traves de una población consiste en relegar pequenas porciones en diferentes puntos para que inicien el proceso de substitución. El gen refractario debe ser resistente a los efectos de la inmigracion. Cierta grado de recombinacion es inevitable pero es necesario que haya una fuerte unión entre el plásmido o transposon y el gen refractario que se encuentra dentro de él.

Una proyeccion a 10 años indica de por si una alta tasa de recombinación lo cual incrementa la posibilidad de que el gen

refractario de interes se pierda entre la poblacion de estudio (Curtis 2007) Sin embargo ya se ha comprobado que 8 de 9 cepas de *R rhodnii* que ya habian sido modificadas geneticamente pasaron la evaluación del gen foráneo en el cual se queria probar cuantas generaciones podian mantener la modificacion genetica Los resultados fueron asombrosos ya que 8 cepas llegaron a 100 generaciones (Anderson *et al* 2004)

La cecropin A un aminoácido de 38 peptidos pertenece a una familia de péptidos que forman pequenos canales en las membranas biologicas causando lisis y muerte celular por lo que tiene una potente actividad antimicrobiana

Este peptido ha sido aislado de varios insectos en los cuales actua como una defensora contra bacterias patogenas La cecropin A tiene una fuerte actividad litica contra el *T cruzi* pero no tiene ningun efecto nocivo contra *R rhodnii* ó los téjido de *R prolixus*

Se ha comprobado mediante ensayos de laboratorio que las colonias de *R prolixus* que contenian el gen transformado para expresar cecropin A eran refractarios a la infección por la cepa DM28 de *T cruzi* aproximadamente en un 70% (Durvasula 1997)

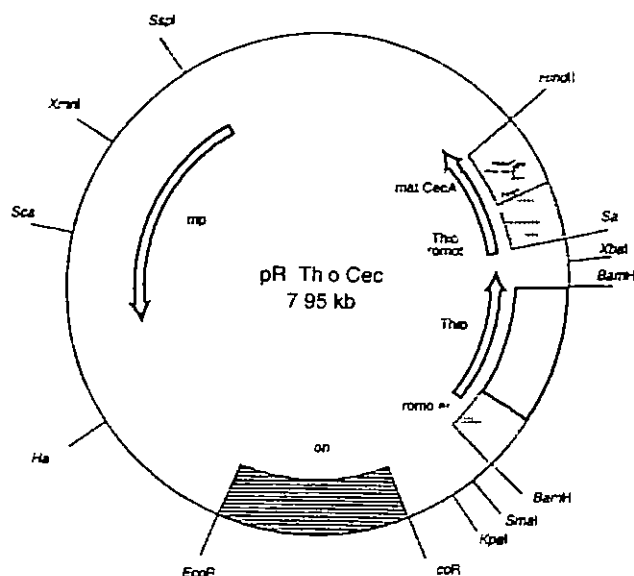


Fig 11 Expresión genética de la Cecropin A
(Durvasula 1997)

C 1 3 Regulaciones y seguridad de insectos

paratransgenicos

El Departamento de Agricultura Animales y Plantas del Servicio de Inspección U S A regula el dispersamiento de artrópodos transgenicos de importancia en la agricultura Ninguna de sus regulaciones se refiere directamente a artrópodos modificados genéticamente que son vectores de enfermedades humanas

Los principios en cuanto a la investigacion con vectores transgenicos y paratransgenicos son similares a los aplicados a los trabajos con insecticidas biológicos Actualmente un comité virtual es el que se dedica a evaluar las propuestas de dispersar artropodos transgénicos que pueden afectar plantas o animales pero aun está

en proceso de organizar uno que se dedique a evaluar propuestas que afecten a humanos (Biosafety in microbiology and biomedical laboratories 1993)

D Patogenicidad en *Rhodococcus* spp, *Dietzia maris* y *Bacillus sphaericus*

Rhodococcus equi ha sido reconocido como un patógeno de las focas por mas de 70 años. Las infecciones de las focas son normalmente respiratorias y los síntomas consisten en fiebre y malestar general. Las lesiones sin tratar progresan y causan la muerte por asfixia. La ingestión ó introducción del organismo a través de cortadas puede causar úlceras en el sitio de infección.

En humanos la infección es común en inmunosuprimidos especialmente aquellos afectados por HIV causando abscesos en los pulmones y pneumonia. Las infecciones por *R. equi* son fatales y aun con un diagnóstico rápido y tratamiento adecuado la tasa de mortalidad en pacientes con SIDA es del 55% (Sellon 2000).

No sólo *R. equi* está involucrado en infecciones humanas también *R. erythropolis* causa infección en inmunosuprimidos. *R. rhodochrous* se ha aislado de úlceras corneales y otras especies de *Rhodococcus* han causado meningitis.

Rhodococcus fascias causa infección en plantas resultando en anomalías en el crecimiento (Bell *et al* 1998).

Actualmente solo se han reportado 13 aislamientos del ambiente del género *Dietzia* de los cuales solamente uno se ha

visto implicado en infección humana. Se reportó un caso severo de infección en una prótesis de la cadera por *Dietzia maris*. Se propone que este microorganismo sea considerado un potencial patógeno nosocomial asociado con material del ambiente. Tanto *Dietzia maris* como *Dietzia natronolimnaio* son capaces de crecer en ambientes salados, por lo que las soluciones salinas utilizadas para la limpieza de heridas quirúrgicas pueden ser la causa de infección (Pidoux, Argenson y Drancourt, 2001).

Bacillus sphaericus es una especie heterogénea de bacteria que contiene cepas que pertenecen al menos a 5 diferentes grupos homólogos de DNA. Las bacterias en estos grupos son tan fenotípicamente similares que no es práctico separarlas en diferentes cepas. El grupo homólogo IIA sí difiere de otras especies en que contienen cepas que son patógenas para la larva del mosquito. La patogenicidad es causada por una o dos proteínas tóxicas. Una de ellas, de 100 kDa, es producida por células vegetativas y las bacterias que la producen poseen baja toxicidad. La otra toxina es producida en el momento de la esporulación y se acumula en el esporangio como un cuerpo parasporal, al igual que ocurre con *Bacillus thuringiensis*; sin embargo, estas toxinas son de diferente naturaleza (Correa y Yousten, 2000). El fragmento que contiene el gen que codifica la proteína citolítica *CytIIA/I* de *Bacillus thuringiensis* subespecie medellin se ha insertado en las cepas 2362/2297 y lab872 de *Bacillus sphaericus* a través de electroporación utilizando el vector pMK3. Ha sido posible realizar

una transformación genética porque se ha registrado resistencia contra *Culex pipens*. (Thiery, *et.al*, 1998)

E. Diversidad de las asociaciones con simbios

E.1 *Rhodnius pallescens*

La orden *Hemiptera*, al cual pertenece la familia *Reduviidae* apareció en el periodo geológico pérmico hace 215 millones de años, mucho antes de la aparición del hombre en la tierra.

Los *redúvidos* pueden ser de tamaño pequeño a grande y de cuerpo delgado o robusto; cabeza angosta, mas larga que ancha y terminando en punta con pico corto; ojos compuestos grandes, la antena filiforme de 4 a 5 segmentos. (Zapata *et.al*, 1999)



Fig. 12 *Rhodnius pallescens*
(Zapata *et. al.*, 1999)

Rhodnius pallescens es el vector más comúnmente aislado en Panamá, tiene la mayor capacidad vectorial ya que tiene una alta tasa de infección por *T. cruzi*. Además exhibe características peridomiciliarias y es colectado frecuentemente en las habitaciones humanas. (Zeledon, 2006)

En un estudio entomológico, mediante la disección de la palma *Attalea butyracea* se encontró un 87% de infestación. Sin embargo, importantes diferencias fueron observadas cuando la información fue disgregada por sitio de colecta. Así, las palmeras colectadas en el bosque tropical tenían una densidad de 7 insectos por palmera, mientras que aquellas cortadas en las granjas de la región de Mendoza, Colombia, proporcionaban 38 triatominos por palma. (Ortega-Barría, 2000)



Fig. 13 Palma *Attalea butyracea*

Genéticamente está establecido que *Rhodnius pallescens* deriva de *Rhodnius pictipes*, que se encuentra en la región amazónica, diferenciándose a través del Valle del Río Magdalena en Colombia como *Rhodnius colombiensis* y en El Ecuador y el norte del Perú como *Rhodnius ecuadoriensis*.

Las poblaciones de *R. pallescens* y *R. colombiensis* en primer lugar están asociadas con palmeras particularmente del género *Attalea*, mientras que las poblaciones de *R. ecuadoriensis* están

asociadas con las palmeras *Phytolophas aequatorialis* sin embargo hay evidencias de una incipiente domesticación de estas especies de triatomíneos particularmente de *R. pallescens* y *R. ecuadoriensis* (Schofield 1997)

E 2 Simbiontes bacterianos

Rhodnius prolixus es el principal vector de la enfermedad del Chagas en ciertas regiones de América Central y el norte de Sur America *Rhodococcus rhodnii* es un actinomiceto que reside en forma extracelular en el lumen de *R. prolixus* en proximidad de *T. cruzi* y es transmitido efectivamente de un triatómino adulto a su progenie a través de la coprofagia o ingestión de materia fecal de otro triatómino) El rol vital de *R. rhodnii* en el crecimiento y desarrollo de *R. prolixus* se ha demostrado repetitivamente dentro de las condiciones de laboratorio (Baines 1956) Ninfas aposimbióticas de *R. prolixus* (insectos que han sido curados de simbiosis) no alcanzan la madurez sexual y la muerte de la ninfa ocurre después del segundo estadio La introducción de la bacteria durante el primer estadio permite un desarrollo normal (Beard Durvasula y Richard 1998) Sin embargo el rol del simbiote dentro de *Rhodnius prolixus* ha sido vuelto a investigar utilizando otro método más preciso la substitución de los simbiosis salvajes por mutantes *in vitro* que son incapaces de sintetizar particularmente las vitaminas del grupo B como las nicotinamidas tiaminas piridoxina riboflavina ácido para aminobenzoico ó biotina

Los insectos libres de simbiosis en el estadio IV si son infectados con un mutante incapaz de sintetizar las vitaminas del grupo B son capaces de cambiar al estadio V sin exhibir ningun disturbio en el desarrollo. Los simbiosis utilizan como fuente de carbono los eritrocitos captados de la alimentacion del triatomino por lo que continuan la glicólisis dentro del vector. Cambios ciclicos en los niveles de glucosa pueden influenciar en el desarrollo del *T. cruzi* el cual lleva a cabo parte de su ciclo de vida dentro del estomago de *Rhodnius prolixus* (Hill 1976)

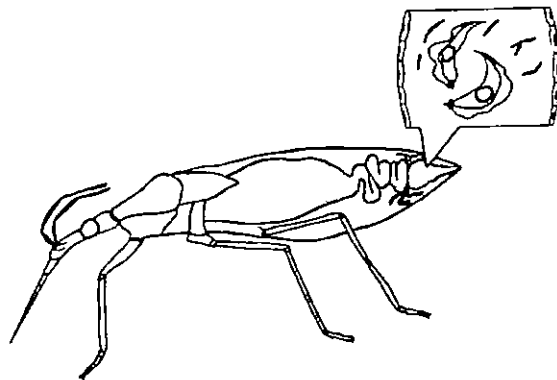


Fig 14 Parte del intestino donde se desarrolla el *T. cruzi* (Bourtzis y Miller 2006)

Los simbiosis bacterianos pueden ser utilizados como vehículos para expresar genes foraneos en artrópodos. Una manera de reducir la transmisión de enfermedades a traves de los artrópodos es modificando genéticamente las bacterias que viven en simbiosis con él. A estos artrópodos se les llama paratransgenicos.

El simbiosis *R. rhodni* es apropiado para una modificacion genética ya que comparte el mismo nicho con el *T. cruzi* dentro del

intestino medio de *Rhodnius prolixus*. Se intenta investigar moléculas que se adhieren a múltiples sitios del *T. cruzi* y desarrollar un panel de anticuerpos anti-tripanosoma. Una glicoproteína de superficie, gp72 recombinante participa integralmente de la maduración del *T. cruzi*, siendo esta, la principal molécula a ser desarrollada. Un marcador genético codificado para la resistencia al antibiótico thiostrepton fue expresado por simbiosis transgénicos dentro del intestino de insectos colonizados experimentalmente. El gen para este péptido estaba contenido en un plásmido utilizado para transformar *R. rhodnii*, que consecuentemente expresó y secretó el producto del gen dentro del intestino medio del triatomino. (Beard, Durvasula, Richards, 1998)

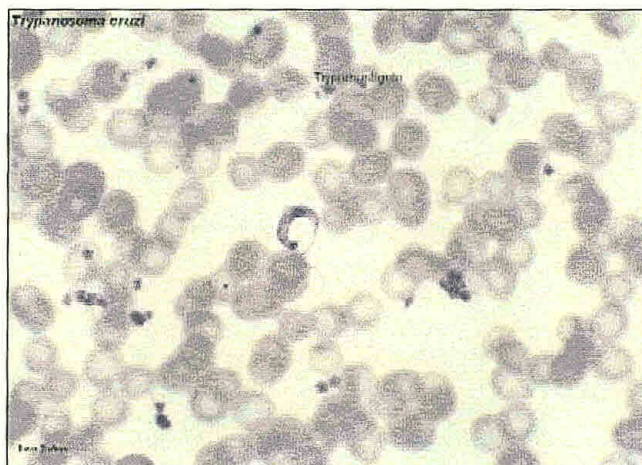


Fig. 15 *T. cruzi* teñido con Giemsa
(.Beard et al., 1998)

E 3 Tipos de Simbiontes

Los simbiontes primarios se pueden definir como microorganismos intracelulares que se requieren estrictamente para el crecimiento y reproducción del huésped y se transmiten de forma vertical. Funcionan como mutualistas nutricionales.

Los simbiontes secundarios o facultativos no se requieren estrictamente para el desarrollo y reproducción del huésped. Se transmiten maternalmente pero también horizontalmente (Bourtiz y Miller 2006).

Buchner en 1965 denomina a los simbiontes primarios de la a a la d reservando nombres adicionales para los simbiontes facultativos de la f a la t. Los simbiontes P se transmiten maternalmente a la progenie y la asociación es obligatoria ya que la eliminación de estos simbiontes resulta en muerte del huésped. La función principal de este tipo de simbionte es balancear la dieta pobre del huésped mediante la síntesis de aminoácidos esenciales (Buchner 1965).

Los simbiontes S son los simbiontes facultativos ó bacterias asociadas lo que quiere decir que universalmente no están presentes dentro del insecto y por lo tanto no tiene una función esencial en el huésped. Se transmiten tanto horizontal como verticalmente a la progenie. Su cocladogénesis no es similar en relación al huésped lo que indica que los simbiontes S se adquieren a través de múltiples infecciones adquiridas recientemente.

Al contrario de la relacion de los simbiositos P cuya relacion con el huésped es ancestral La cocladogénesis se refiere a que el árbol filogenético de los simbiositos P es similar al árbol filogenético del huésped lo que indica que la evolución de los simbiositos P es vertical

Los simbiositos S pueden no tener un efecto detectable o una variedad de efectos sobre el huésped En algunos casos el efecto puede ser negativo dependiendo de las condiciones del cultivo

Dentro de los efectos positivos que le confiere al huésped están sobrevivencia al estrés producido por el calor resistencia a adquirir parásitos y diferencias en las preferencias del huésped

Como efectos negativos están alteraciones en el crecimiento reproducción y longevidad del huésped (Bourtiz y Miller 2006)

E 4 Otros tipos de simbiosis

La simbiosis intracelular dentro de un bacteriocito de un chinche de hojas representa una de las más íntimas relaciones entre una bacteria y una célula eucariota Casi todas las especies de los chinches de hojas tienen entre 60 80 células llamadas bacteriocitos dentro de las cuales hay unas vesículas que contienen unas bacterias designadas *Buchnera*



Fig. 16 Chinche de hojas (áfido)
(Baumann,2000)

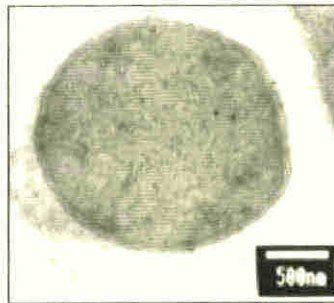


Fig. 17 Bacteriocito conteniendo a *Buchnera*
(Baumann *et. al.*, 1995)

Los embriones que se desarrollan partogenéticamente dentro del ovario de la madre son infectados por *Buchnera* durante una fase temprana del desarrollo y por ello el endosimbionte es transmitido de generación en generación dentro del huésped sin tener ninguna fase libre.

Buchnera son células procariotas de 1-2 μm de diámetro y pertenecen a las γ -proteobacterias que están relacionadas estrechamente a las *Enterobacteriaceae*. Un análisis filogenético, basado en las secuencias 16srDNA, reveló que la relación simbiótica con los chinches de hojas se estableció hace 250 millones de años. (Baumann, 1995)

Buchnera provee al huésped con aminoácidos esenciales. El endosimbionte contiene un plásmido de dos genes *trpEG*, que son

importantes en la síntesis del triptófano. Cada bacteria contiene 3 ó 4 plásmidos que contienen 4 tandas repetitivas de estos genes, resultando en 12-16 copias de *trpEG*.

Los chinches de hojas al ingerir el floema (tejido de conducción en plantas), ingieren glutamina que luego es transportada a los bacteriocitos, los cuales la convierten en ácido glutámico, el cual es utilizado por el endosimbionte para sintetizar otros aminoácidos necesarios para el desarrollo de los chinches de hojas. (Baumann, 2000)

Carsonella y *Portiera* son endosimbiontes P de los piojos de plantas y las moscas blancas que están relacionados directamente con *Pseudomonas*.



Fig. 18 Moscas blancas

El endosimbionte P de las hormigas carpinteras y la mosca tse-tse, *Buchnera*, está relacionado con la familia *Enterobacteriaceae*. (Bourtiz y Miller, 2006)

METODOLOGIA

Colecta, almacenaje y alimentacion de *Rhodnius pallescens*

La colecta tuvo lugar en Arraijan y Chorrera (al oeste de la ciudad de Panamá) Pacóra (al este de la ciudad de Panama) y en Chilibre (al norte de la ciudad de Panamá) *Rhodnius pallescens* se encuentra muy a menudo en la Palma de Corozo *Scheelea zonensis* o *Atallea butyracea* por lo que es el principal punto de búsqueda. Una vez identificada la palma se procedio a la diseccion del microhabitat que consiste en su tala y el corte de pencas en busca de los triatominos. Los triatominos que se capturaron se colocaron en frascos de vidrio rotulados con el area de colecta, fecha y nombre del colector. Dentro del frasco se coloco una hoja de papel plegado en su interior para favorecer el desplazamiento. Se tapó con tapa de rosca con pequeños agujeros para su posterior alimentación. Antes de almacenarlos se le hizo un directo a las heces para determinar su positividad a *Trypanosoma spp*.

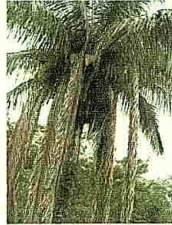
El almacenaje

Los triatominos fueron conservados en un cuarto oscuro a una temperatura entre 24-26 °C que es la ideal para su desarrollo.

Flujograma 1

Colecta de *Rhodnius pallescens*

Ir a Chorrera, Arraiján, Pacora y Chilibre



Palma *Atallea butyracea*

Localizar las palmas adecuadas "palma real". Deben estar secas y no muy abiertas.



Cortar con hacha o cierra. Observar de no perjudicar los alrededores.



Quitar las pencas una por una en busca de triatominos.



Rhodnius pallescens adulto. Deben colectarse con guantes para evitar infecciones.



Colocar los triatominos en un frasco de vidrio con tapa. La tapa debe tener agujeros pequeños para evitar el escape de la ninfas de segundo estadio. Colocarle al frasco etiquetas que contengan información de la colecta: Lugar, fecha y nombre del colector.

Durante el transporte, el frasco debe ir en un ambiente fresco para evitar que mueran los triatominos.

Para el almacenaje debe reemplazarse la tapa por un lienzo sujetado por una liga.

La alimentación

Una vez colectados los triatominos se procedió a clasificarlos escogiendo solamente a *Rhodnius pallescens*. Se alimentaron de forma semanal con sangre de gallina a través de una gaza. Este proceso duraba aproximadamente de 15 a 20 minutos. La señal de que se habían alimentado era su abdomen abultado (Instituto Conmemorativo Gorgas 2007).

Disección de *Rhodnius pallescens*

Se tomaron con una pinza los triatominos a disectar del frasco de almacenaje y se sumergieron en yodo por 5 minutos. Luego se transfirieron a alcohol al 70% por otros 5 minutos. Fueron colocados en un plato de vidrio sobre la base del estereoscopio. Dentro del mismo el triatomo se coloca sobre el dorso para su disección. Las pinzas de disección deben ser esterilizadas en el mechero y enfriadas en agua destilada estéril previo a su utilización. Se procedió entonces a separar el tórax del cuerpo y se extrae el sistema digestivo. Rápidamente se hizo un frotis directo siembra en agar Sangre, agar *Rhodococcus* y BHI (Brain Heart Infusion). Una vez terminado el procedimiento se esterizaron las pinzas en el mechero y se sumergieron en etanol al 70% para continuar con el siguiente ejemplar (Espino 2007). A los triatominos de colonia se les realizó una tinción de Gram, mientras que a los de campo una placa directa (5 días después de su colección) en busca de *Trypanosomas cruzi*.

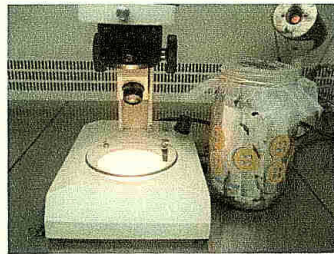
Flujograma 2

Disección de *Rhodnius pallens*

Desinfectar la cámara de trabajo con alcohol al 70%,
prender el mechero, la luz y aire de ventilación de la cámara

Atemperar platos de agar sangre, agar Rhodococcus y caldo
BHI

Sacar el frasco de triatominos del cuarto oscuro.



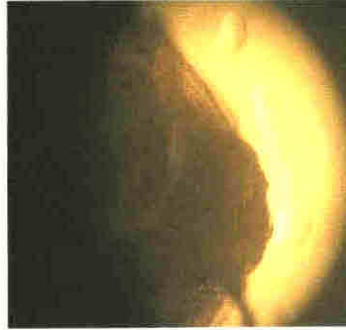
Colocar el estereoscopio dentro de la cámara con un vidrio
reloj esterilizado.



Servir en vasos químicos el yodo al 5% y el alcohol al 70%.
Colocar las pinzas dentro del alcohol, después de haber
sido pasadas por el mechero.



Triatomino macho



Triatomino hembra

Sacar del frasco el triatomino a disectar y sumergirlo en el yodo al 5% por 5 minutos, luego trasferirlo al alcohol al 70% por 5 minutos. Colocar el triatomino sobre el dorso y observar la punta del abdomen. Si es roma indica que es hembra, macho si es puntiaguda.



Tomar una pinza con punta fina y jalar desde la punta del abdomen el intestino delgado del triatomino. Realizar un directo y un frotis. Sembrar directamente en agar sangre, agar Rhodococcus y caldo BHI.

Incubar a 37°C los platos y tubos por espacio de 120 horas antes de su descarte. Observar cada 24 horas y anotar cualquier crecimiento. Aislar si es necesario.

Cultivo del sistema digestivo de *Rhodnius pallescens*

El sistema digestivo fué sembrado directamente en agar Sangre agar *Rhodococcus* y caldo BHI e incubado a 37 C La aparición de colonias no hemolíticas redondas frecuentemente mucosas con un pigmento rosado salmon que se desarrolla dentro de 4 a 7 días de incubación es indicativo de *Rhodococcus spp*

Antes de cultivar el sistema digestivo se realizó una tinción de Gram en la cual se observaron cocos y cocobacilos Gram positivos (Weissfeld *et al* 1998)

Principios, procedimientos e interpretación de medios utilizados

1 Agar Sangre

Principio El agar sangre es un medio al cual se le puede añadir sangre para aislar y cultivar organismos fastidiosos El pH ligeramente ácido de la base favorece reacciones hemolíticas precisas

Procedimiento Con un asa calibrada (ver apartado de procedimientos) tomamos la muestra en cuestión o cepa y estriamos directamente en el plato Incubamos de 30 37 C por 7 días según el organismo deseado (Manual Difco 1984)

Interpretación Las cepas de *Rhodococcus* suelen presentar un color blanco inicialmente luego cambian de coloración a un amarillo claro y finalmente cuando la cepa ya tiene 120 horas toma un color

nararanja rosa. Otras cepas menos frecuentes son translucidas, pero al ser transferidas al medio *Rhodococcus* se tornan entre blancas y amarillo claro con un halo de digestión al medio. (Según observaciones experimentales nuestras)

2 Agar Rhodococcus

Principio Los ingredientes de este medio son eficaces para la recuperación de organismos de crecimiento lento cuyo desarrollo es fastidioso. La preparación del gel de agarosa es de suma importancia para la obtención de morfología y pigmentos deseados. Debe agregarse más agarosa del estándar (2%) para que el medio gelifique. El extracto de levadura es muy importante para el ciclo de la morfología de la bacteria: cocos (coco bacilos) cocos. Al servir el medio en el plato debe servirse 25 ml, un poco más del estándar (20 ml) para que no se seque antes de que la colonia alcance la madurez.

Procedimiento Tomamos la muestra en cuestión o cepa y estriamos directamente en el plato. Incubamos a 30-37 °C por 7 días.

Interpretación Observamos el crecimiento de la cepa en cuestión. Debe aislarse cualquier crecimiento. Las especies de *Rhodococcus spp* presentaron colonias con pigmentos variados entre amarillo, naranja, rojo y rosa. La cepa apareció generalmente después de 4 días de incubación. El color y textura van variando mientras la cepa envejece, de manera que a los 7 días se vuelve mucosa y de

color rosa amarillo naranja o rojo (Segun observaciones experimentales nuestras)

3 Caldo BHI

Principio Este medio es nutritivo para soportar el crecimiento de un rango amplio de microorganismos como streptococos pneumococos meningococos incluyendo levaduras y hongos

Procedimiento Con un asa calibrada tomamos la muestra en cuestión e inoculamos en el medio líquido Incubar de 35 a 37 C

Interpretacion Observar las características del tubo Turbidez indica crecimiento Para observar las características morfológicas de la colonia realizar un pase al medio adecuado para la recuperación de la bacteria en cuestión (Manual Difco 1984)

Las especies de *Rhodococcus* se desarrollan bien en este medio sin embargo el pase a agar sangre o agar para *Rhodococcus* debe realizarse durante las 24 horas para evitar contaminación o posible encubrimiento de crecimiento de otras cepas no deseadas que se encuentren en la muestra (Segun observaciones experimentales nuestras)

Tinciones utilizadas

1 Coloracion de Kinyoun

a) Preparamos el frotis igual que para Ziehl Neelsen y lo fijamos con calor

b) Colocamos la lamina en la gradilla de coloracion y dejamos que se enfrie Cubrimos el frotis con fuchsin de Kinyoun y dejamos que se coloree por 4 minutos No es necesario calentar

- c) Lavamos con agua corriente
 - d) Decoloramos el frotis con alcohol ácido por 10 segundos
 - e) Lavamos con agua corriente
 - f) Cubrimos el frotis con azul de metileno por 2 minutos
 - g) Lavamos con agua corriente
 - h) Dejamos secar al aire libre y examinar con aceite inmersión
- (Kinyoun 1915)

2 Gram Elaboramos un frotis a partir de la muestra en cuestión Una vez fijada con calor agregamos cristal violeta durante 1 minuto y enjuagamos Seguidamente agregamos yodo de Gram por 1 minuto y enjuagamos Luego agregamos alcohol acetona al 70% y enjuagamos rápidamente Por ultimo agregamos safranina por 30 segundos

En el caso de los Actinomycetos no siempre muestran una morfología tan característica muchas veces no se ven en absoluto o aparecen como cocos bacilos o filamentos cortos Gram positivos (Weissfeld *et al* 1998)

Preservación de cepas

En un tubo estéril de plástico colocamos 5 ml de caldo Trypticase soya con 5% de glicerol Inoculamos la cepa a preservar e incubamos a 37 C por 24 horas Colocamos en un congelador a -20 C Para descongelar colocamos en baño María por 10 minutos antes de sembrar para agar Rhodococcus

Cepa control

DSM No 43336 *Rhodococcus rhodnii*

Del catalogo DSMZ

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und zellkulturen
GMBH

Pruebas bioquimicas para *Rhodococcus rhodnii*

Las pruebas bioquimicas han sido de poca utilidad para el diagnostico definitivo de *Rhodococcus rhodnii* debido a la variabilidad de resultados obtenidos Sin embargo hay unas pruebas que generalmente son positivas con algunas excepciones Las pruebas deberan incubarse por 7 dias antes de su descarte y se observarán diariamente para detectar cualquier cambio de pH en el medio

Las pruebas bioquimicas que se utilizaron fueron

1 Catalasa

Principio La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno Es una hemo proteina de estructura similar a la hemoglobina excepto porque los cuatro atomos de hierro de su molecula estan en e estado oxidado (Fe^{3+}) en lugar de estado reducido (Fe^{2+}) Excepto los estreptococos la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa

Procedimiento Con una aguja de inoculación transferimos parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos

Interpretación La aparición rápida y sostenida de burbujas constituye una reacción positiva. Debido a que algunas bacterias poseen enzimas distintas de la catalasa que pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. La observación de unas pocas burbujas pequeñas después de 20 a 30 segundos no se considera un resultado positivo. Además, los eritrocitos poseen catalasa, por lo cual debe tenerse cuidado de no tomar eritrocitos junto con el material de la colonia (Isenberg H 2004)

2 Caldo base con rojo fenol para glucosa manitol sorbitol y rhamnosa

Principio El caldo base rojo fenol es un medio adecuado para la determinación de fermentación de azúcares. El medio es estable de composición uniforme y permite hacer determinaciones a base de viraje de color.

Procedimiento El medio líquido se siembró con un asa de cultivo puro del microorganismo.

Interpretación Cuando el organismo fermenta el azúcar estudiado, el pH del medio baja, entonces el rojo fenol vira de rojo a amarillo.

En el caso de *Rhodococcus rhodni* el manitol sea positivo y que el sorbitol sea negativo (Isenberg H 2004)

3 Citrato

Principio El agar citrato se utiliza para probar si un organismo tiene la habilidad de utilizar citrato como fuente única de energía. Cuando

la bacteria metaboliza el citrato las sales de amonio se reducen a amonia que incrementa la alcalinidad del medio El cambio de pH por arriba de 7.6 hace que el indicador azul de bromotimol cambie de verde a azul

Procedimiento Inoculamos el medio con una colonia bien aislada del medio de cultivo Incubamos de 35-37 °C por 4 días con la tapa floja

Interpretación Un resultado positivo se refleja con crecimiento y cambio de color de verde a azul intenso en el pico de flauta En un resultado negativo no hay crecimiento y no se observa cambio de color El pico de flauta se mantiene verde En las especies de *Rhodococcus* solamente *R. erythropolis* y *R. globerulus* son positivos El resto de las cepas son variables los resultados (Isenberg H 2004)

4 SIM

Principio El test de motilidad se utiliza para detectar la presencia de flagelos en la bacteria El medio semisólido es inoculado en línea recta hacia el centro del tubo Los organismos no motiles sólo crecerán sobre la línea de inoculación

Procedimiento Con un asa estéril inoculamos el tubo en línea recta e incubamos a 35 °C para *Enterobacteriaceae* y a 30 °C para *Enterococos* Si hay una duda con respecto a un resultado negativo incubar a 25 °C

Interpretación Un crecimiento difuso fuera de la línea de inoculación o turbidez del medio indica que la prueba es positiva Un tubo claro igual al medio no inoculado indica que el organismo es no móvil

Todas las especies de *Rhodococcus* son no motiles

(Isenberg H 2004)

5 Urea

Principio La urea es una diamida del ácido carbonico. Todas las amidas se hidrolizan facilmente con liberación de amoniaco y dioxido de carbono. La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos. El amoniaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio lo que produce alcalinización y aumento del pH del medio.

Procedimiento El medio liquido se sembró con un asa de cultivo puro del microorganismo a probar.

Interpretación Un color rojo en todo el medio indica alcalinización e hidrólisis de la urea. Las especies de *Rhodococcus* son generalmente positivas (Wiessfeld *et al* 1998).

Análisis molecular de *Rhodococcus rhodni*

Extracción de ADN

- 1 Centrifugamos 100 µl de BHI liquido con una cepa pura por 15 minutos a 100 000 rpm
- 2 Resuspendemos con 200 µl del botón bacteriano en TE 1X (Tris 10mM pH 8.0 EDTA 1 mM) y luego dos lavadas mas con la misma solución
- 3 Resuspendemos con 200 µl de TE 1X tratado con 100 µl de lisozima (2 mg/ml) e incubado a 37 °C por 30 minutos

- 4 Adicionamos 100 µl de SDS 1% y 100 µl de Proteinasa K (100 µg/ml) Incubamos a 65 C por 4 horas
- 5 Adicionamos 84 µl de NaCl 5M y 60 µl de CTAB e incubamos las muestras a 65 C por 20 minutos
- 6 Se añadió 200 µl de isopropanol y 200 µl de cloroformo alcohol isomilico (24 1) y se invirtieron los tubo 20 veces seguido por una centrifugación por 1 minuto La fase acuosa se descarto Se realizaron extracciones hasta que la fase acuosa y la interfase estuvieron claras En esta ultima extracción se añadió 200 µl de isopropanol y el ADN se dejó precipitar a 20 C por 24 horas se colectó por centrifugacion a 4 C por 30 minutos
- 7 La madeja de ADN obtenida se lavó con etanol al 70% se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en TE 1X (Pavia 2005)
- 8 La concentracion de ADN se midio a través de una corrida con estandares en gel de agarosa en este caso debido a que de *Rhodococcus* se obtiene siempre una alta concentración de ADN se utilizó el marcador Lambda DNA/Hind III con capacidad de hasta 23 130 pb El 1 Kb DNA Ladder es altamente recomendado para medir patrones de restriccion diferencial ya que permite determinar claramente una baja cantidad de pb En el caso del marcador PGEM es dificil diferenciar bandas de bajo peso molecular El Lambda DNA/Hind III se recomienda para determinar el peso molecular del ADN al igual que el DNA marcador VIII En base a esto se presentan algunas relaciones que son utiles para determinar

si se cuenta con la suficiente cantidad de ADN para obtener una
óptima amplificación (Observaciones nuestras)

Relación del DNA marcador VIII Concentración de 250 µg/ml

1 114 pb 102 ng/4 µl de ADN

Relacion del Lambda Hind III Concentracion de 0 5 mg/ml

0 5 mg/ml = 500 µg/ml = 0 500 ng/ml

Seguidamente se transforma la concentración del marcador VIII de

250 µg/ml = 0 250 ng/ml

Si 1 114 pb 102 ng/4 µl

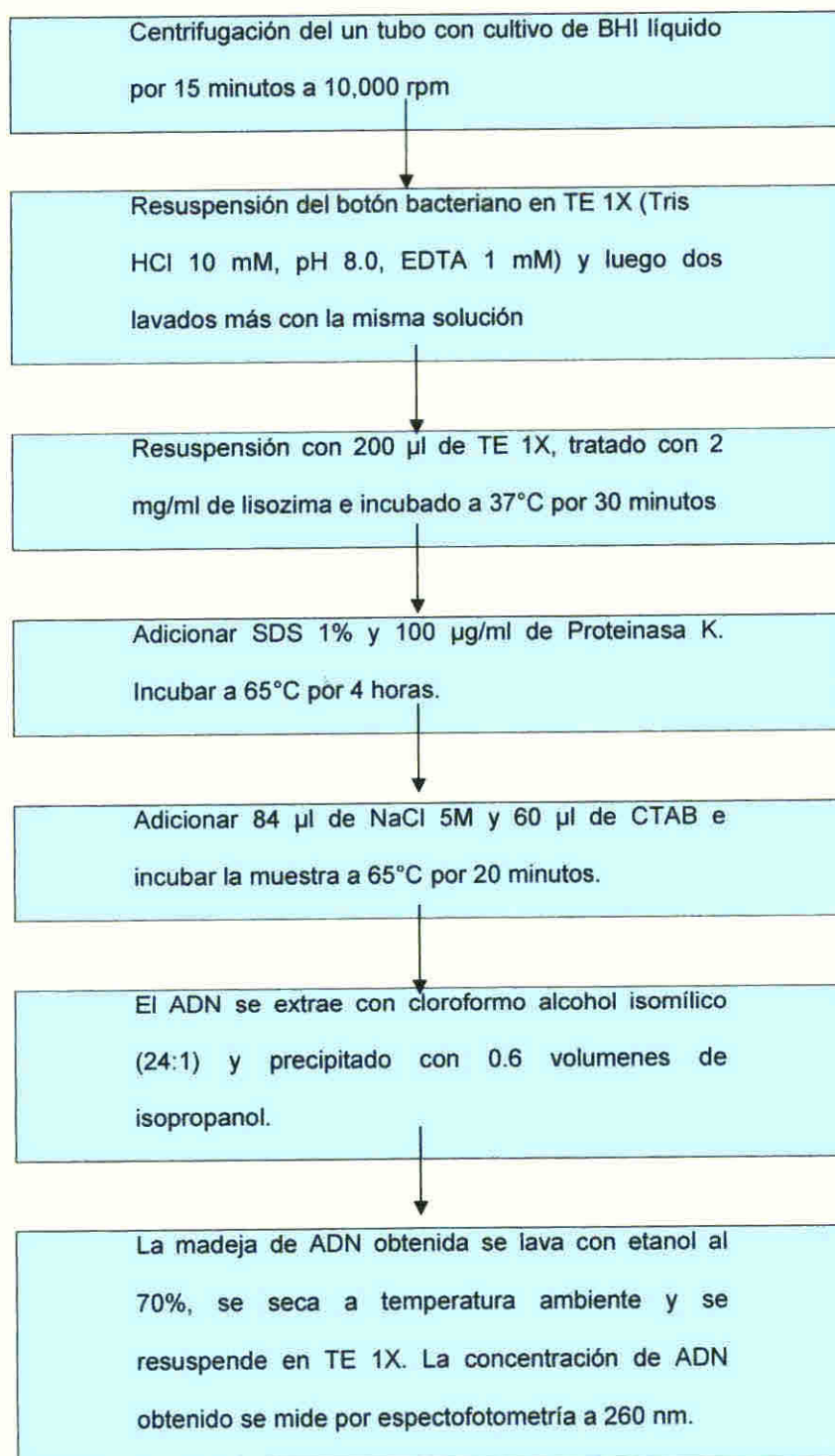
4 361 pb X

X = 399 ng/4 µl a una concentracion de 0 250 ng/ml

Si se desea una concentracion de 0 500 ng/ml = $399 \times 2 = 798$ ng/4 µl

Flujograma 3

Extracción de ADN de *Rhodococcus rhodnii*



PCR

Protocolo

- 1 El Master mix de las reacciones individuales debe tener un volumen final de 28ul
- 2 Desnaturalizacion a 94 C por 5 minutos
- 3 30 ciclos de desnaturalización a 94 C por 1 minuto
- 4 Alineamiento a 55 C por 1 minuto
- 5 Extension a 72 C por 1 minuto
- 6 10 minutos más de extensión para mayor acoplamiento de los productos a 72 C por 1 minuto
- 7 Visualizamos 5 µl del producto de amplificación mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa TAE 1% a 100v por 30 minutos (Hypsa y Dale 1997)

Control de reactivos

Reactivo	Lote	Cantidad
PCR nucleotide mix (dNTP)	23118015	200 µl (10 mM)
Buffer 10X	19933525	1 2 ml
MgCl ₂	19731453	200 µl (25 mM)
Taq DNA Pol	19358939	5 µg/µl
Primer 16 F	889C11	123 5 µg
Primer 16 R	889C12	115 87 µg

Mezcla de reaccion

H ₂ O Milli Q	15 µl
Buffer 10X	2.5 µl
MgCl ₂	1.5 µl
dNTP S	2.5 µl
Primer F	0.5 µl
16F (5' GCTTAACACATGCAAG 3')	
Primer R	0.5 µl
16R(5' ACGGGCAGTGTGTACAAGACC 3')	
Taq Polymerasa	1.0 µl

Se multiplica cada ingrediente por el numero de muestras a ampliar. Se agrega a la mezcla 5.0 µl de ADN.

Tipo de gel para electroforésis TAE 1% a 80v por 30 minutos

PCR RFLP

Los productos de amplificación obtenidos con cada una de las bacterias fueron sometidos a digestión con diferentes endonucleasas *Pst* I, *Hind* III, *Bam* HI, *Eco* RI y *Kpn* I. Los perfiles de restricción obtenidos se observaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% y coloreadas con bromuro de etidio. Se analizaron los perfiles de restricción comparando los resultados con los algoritmos de diferenciación para *Rhodococcus equi* y *Rhodococcus rhodnii*.

Protocolo de restriccion

Agua desionizada 16 3 µl

RE 10X Buffer 2 0 µl

BSA acetilado(10 µg/µl) 0 5 µl

DNA 2 0 µl

Mezclar con la pipeta varias veces

Enzima de restricción (10 µg/µl) 0 5 µl

A continuación si la bacteria es sospechosa de ser *Rhodococcus* incubamos a 37 C por 3 horas en baño Maria Si la bacteria no es del miembro de la familia de los Actinomycetes entonces la incubamos debe durar solamente 1 hora Al terminar las incubaciones se congela a 20 C si no va a realizarse la electroforesis para observar el patrón diferencial el mismo dia

Tipo de gel para electroforesis TBE 1X 1% Las bandas migran más lento pero se muestran con mayor precisión

RESULTADOS

1 Colecta de triatominos

La colecta de *R pallescens* se realizo en diferentes sectores de la Provincia de Panamá durante el año 2008. La primera colecta se realizo en El Espino Chorrera de una palma real de casa de familia se obtuvieron 15 *R pallescens* y 3 *T dimidiata*. La segunda colecta fue en Burunga Arraiján y se obtuvieron 20 triatominos. La tercera colecta se llevo a cabo en Carriazo Pacora se recuperaron 18 *R pallescens*. La cuarta colecta se realizó en Santa Rosa Chilibre en una finca con ganado vacuno. Notamos que habia llovido bastante la noche anterior y se encontraron 10 alacranes. En la primera palma que se derribo solo se encontraron 2 *R pallescens*. Nos movilizamos hacia el lado opuesto de la finca y se lograron coleccionar 14 *R pallescens*.

Como podemos observar en el cuadro N° 1 la mayor cantidad de triatominos se obtuvo de Burunga (Arraiján). Sin embargo el numero de simbriones aislados de *R pallescens* se reduce a 1/3 en todas las colectas por lo que el numero de simbriones aislados es independiente del numero de triatominos coleccionados.

CUADRO N° 1
COLECTA DE *RHODNIUS PALLESCENS* Y SIMBIONTES POSITIVOS
AISLADOS EN DISTINTAS AREAS DE LA PROVINCIA DE PANAMA,
AÑO 2008

Áreas de colecta	Chorrera El Espino *(CHO)	Arraiján Burunga *(BUR)	Pacora Carriazo *(CAR)	Chilibre St. Rosa *(CHI)	TOTAL
# de palmas derribadas	1	1	1	2	5
# <i>Rhodnius pallescens</i> colectados	15	20	18	16	68
# Simbiontes aislados de <i>Rhodnius Pallescens</i>	8	7	8	6	29

*Abreviación que denomina el sitio de procedencia de la cepa, el cual, es utilizado en cuadros posteriores para designar a las cepas recuperadas. CHO= Chorrera, BUR= Burunga, CAR= Carriazo y CHI= Chilibre.

Se determinó que era importante clasificar la población de triatomos colectados según su sexo para observar si existe alguna tendencia del sexo en cuanto a los aislamientos de *Rhodnius pallescens*. En el cuadro N°2 y N°3 se observa que el sexo de *R. pallescens* es independiente de la cepa aislada de *R. rhodnii*; sin embargo se observa claramente que la relación de las hembras con respecto a los macho es de 2:1.

Cuadro N° 2.
Simbiontes aislados de *Rhodnius pallescens*,
según sexo, mantenidos en cautiverio por más
de tres generaciones procedentes de Darién,
año 2008.

Aislamiento/sexo	Femenino	Masculino	Total
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	20	5	25
<i>Corynebacterium spp</i>	3	2	5
Total	23	7	30

De los *Rhodnius pallescens* de colonia, provenientes de la Provincia de Darién, 20 (66%) hembras poseen el simbionte de *R. rhodnii*, mientras que solo 3 (10%) poseen como simbionte a *Corynebacterium spp.* En cuanto al sexo masculino, 5 (17%) alojan a *R. rhodnii*, mientras que a *Corynebacterium spp.* solamente 2 (6%).

Cuadro N°3									
Simbiontes aislados de <i>R. pallescens</i> de campo según sexo y sitio de colecta, Provincia de Panamá, año 2008.									
Aislamiento	Sitio de colecta y sexo								
	El Espino (Chorrera)		Burunga (Arraiján)		Pacora (Carriazo)		Santa Rosa (Chilibre)		Total
	F	M	F	M	F	M	F	M	
<i>Rhodococcus rhodnii</i>						2			2
<i>Corynebacterium spp.</i>	6		1	2					9
<i>Gordonia spp.</i>	1	1	1		1	3			7
<i>Bacillus sphearicus</i>				2			3	3	8
<i>Dietzia maris</i>			1		2				3
Total	7	1	3	4	3	5	3	3	29

En el cuadro N°3 se observa claramente que en hembras de *Rhodnius pallescens* del Espino, Chorrera, el simbionte con mayor frecuencia de aislamiento fue *Corynebacterium spp.* En segundo lugar, se observa *Bacillus sphearicus* en *Rhodnius pallescens* machos provenientes principalmente de Chilibre, Santa Rosa. Y por último, se encuentran las *Gordonias spp.* con mayor incidencia en Carriazo, Pacora de *R. pallescens* machos. En cuanto a *Rhodococcus rhodnii*, solamente se encuentran 2 aislamientos en los *R. pallescens* de campo y cuyo sexo era masculino.

2 Morfología del cultivo de *Rhodococcus spp*

La característica morfológica de las colonias aisladas como su pigmentación y textura pueden ser utilizadas para la identificación presuntiva. En el cuadro N 4 podemos apreciar que las colonias blancas no mucosas con halo digestivo (ver Fig 19) fue observado en el género *Corynebacterium spp* en las bacterias designadas CHO1 CHO2 CHO3 CHO4 CHO7 Y CHO16 aislados de triatomíneos de Chorrera.

Las colonias transparentes mucosas se encuentran principalmente en Chilibre y Burunga siendo las de Chilibre las CHI46 CHI47 CHI48 CHI49 CHI50 Y CHI51 mientras que para Burunga se encuentran BUR28 BUR30 BUR52 BUR53 y BUR56. Solamente se encontraron dos colonias naranja intenso y mucosa BUR24 y CAR45.

Las colonias rosa vieja provienen de Carriazo Pacora. La mayoría de los *R. rhodnii* que poseen color salmón a rosa pálido y no mucosa fueron recuperados de los triatomíneos en cautiverio por más de tres generaciones.

CUADRO N°4 Pigmentación, morfología y procedencia de colonias de <i>Rhodococcus rhodnii</i> y especies relacionadas de cautiverio y campo en la Provincia de Panamá, año 2008											
Simbiontes	Pigmentación, morfología y procedencia										
	Colonia blanca no mucosa con halo digestivo en el medio		Colonia transparente semi-mucosa		Colonia naranja intenso mucosa		Colonia rosa vieja, mucosa		Colonia salmón a rosa pálido, no mucosa		TOTAL
	*CT	**CA	CT	CA	CT	CA	CT	CA	CT	CA	
<i>Rhodococcus rhodnii</i>									26*** (DAR)	2 (CAR)	28
<i>Dietzia maris</i>										1 (BUR) 2 (CAR)	3
<i>Corynebacterium spp.</i>	5 (DAR)	6 (CHO) 3 (BUR)									14
<i>Gordonia spp.</i>						1 (BUR) 1 (CAR)		3 (CAR) 2 (CHO)			7
<i>Bacillus sphearicus</i>				5 (BUR) 6 (CHI)							11
TOTAL	5	6		11		2		5	26	5	63

*CT= Cautiverio, **CA=Campo, ***DAR= Darién, CHO= Chorrera, BUR= Burunga, CAR= Carriazo y CHI= Chilibre.

Finalmente, dentro de las colonias color salmón, hay un grupo señalado en azul, *Dietzia maris*, que morfológicamente su colonia es idéntica a *R. rhodnii* y que solamente puede diferenciarse definitivamente a través de técnicas moleculares como PCR-RFLP.



Fig. 19 Halo digestivo de *Corynebacterium* spp



Fig. 20 Colonias de *Rhodococcus rhodnii* sobre agar Rhodococcus.



Fig. 21 Color y aspecto de la colonia de *Rhodococcus rhodnii* en agar sangre (es muy difícil de diferenciar de cepas que no son *Rhodococcus* spp).



Fig. 22 Colonia de *Dietzia maris* (la morfología de la colonia es idéntica a *Rhodococcus* spp, solamente se puede identificar con certeza a través de un patrón diferencial por PCR-RFLP)



Fig. 23 Colonia de *Gordonia* spp. (interesante observar que posee la misma coloración de *Rhodococcus* spp. pero su textura mucosa difiere).



Fig. 24 Colonia de *Gordonia rubripertincta*. (observe el intenso color naranja y su textura mucosa, propia del género *Gordonia* spp.



Fig. 25 *Bacillus sphearicus* sobre agar *Rhodococcus*. (su contexture es semi-mucosa y de color blanco transparente)



Fig. 26 *Staphylococcus aureus* sobre agar *Rhodococcus*. (interesante el color amarillo que desarrollan las colonias, su textura es semi-mucosa)

3. Tinción de Gram y Kinyoun modificada

La tinción de Gram y Kinyoun modificada también puede utilizarse para la identificación presuntiva para *R. rhodnii*. La tinción de Gram nos ubica en el camino correcto hacia cocos Gram positivos; sin embargo, es la tinción de Kinyoun modificada la que realmente nos diferencia a *R. rhodnii*, *D. maris* y *Gordonia spp.* de los demás microorganismos.

La utilidad de la tinción de Kinyoun modificada es solamente preliminar como se observa en los cuadros N°5, N°6, N°7, N°8 y N°9; ya que debe ir acompañada de la descripción de la morfología de colonia, pruebas bioquímica y técnicas moleculares como PCR-RFLP para una identificación final.

Cuadro N° 5 Tinción de Gram y Kinyoun modificada de <i>Rhodococcus rhodnii</i> y otros simbiontes obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> en cautiverio, procedente de Darién, año 2008			
AISLAMIENTOS	# DE CEPAS POSITIVAS	GRAM	KINYOUN MODIFICADA
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	25	+ (cocos)	+
<i>Corynebacterium spp.</i>	5	+(cocos)	-
TOTAL	30		

Cuadro N° 6 Tinción de Gram y Kinyoun modificada de simbiontes obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> silvestres, procedentes de El Espino, La Chorrera, Provincia de Panamá, año 2008			
AISLAMIENTOS	# DE CEPAS POSITIVAS	GRAM	KINYOUN MODIFICADA
<i>Gordonia spp.</i>	2	+ (cocos)	+
<i>Corynebacterium spp.</i>	6	+ (cocos)	-
TOTAL	8		

Cuadro N° 7			
Tinción de Gram y Kinyoun modificada de simbioses obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> silvestres, procedentes de Burunga, La Chorrera, Provincia de Panamá, año 2008			
AISLAMIENTOS	# DE CEPAS POSITIVAS	GRAM	KINYOUN MODIFICADA
<i>Dietzia maris</i>	1	+ (cocos)	+
<i>Gordonia rubripertinctus</i>	1	+ (cocos)	+
<i>Bacillus sphearicus</i>	2	+ (bacilos)	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	3	+(cocos)	-
TOTAL	7		

Cuadro N° 8			
Tinción de Gram y Kinyoun modificada de simbioses obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> silvestres, procedentes de Carriazo, Pacora, Provincia de Panamá, año 2008			
AISLAMIENTOS	# DE CEPAS POSITIVAS	GRAM	KINYOUN MODIFICADA
<i>Dietzia maris</i>	2	+ (cocos)	+
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	2	+ (cocos)	+
<i>Gordonia rubripertinctus</i>	1	+(cocos)	+
<i>Gordonia spp.</i>	3	+ (cocos)	+
TOTAL	8		

Cuadro N° 9			
Tinción de Gram y Kinyoun modificada de simbioses obtenidos de <i>Rhodnius pallescens</i> silvestres, procedentes de Chilibre, Santa Rosa, Provincia de Panamá, año 2008			
AISLAMIENTOS	# DE CEPAS POSITIVAS	GRAM	KINYOUN MODIFICADA
<i>Bacillus sphearicus</i>	6	+ (bacilos)	-
TOTAL	6		

Rhodococcus rhodnii presenta una variabilidad morfológica en la curva de crecimiento que puede ser apreciada con la tinción de Gram en sus distintas fases:

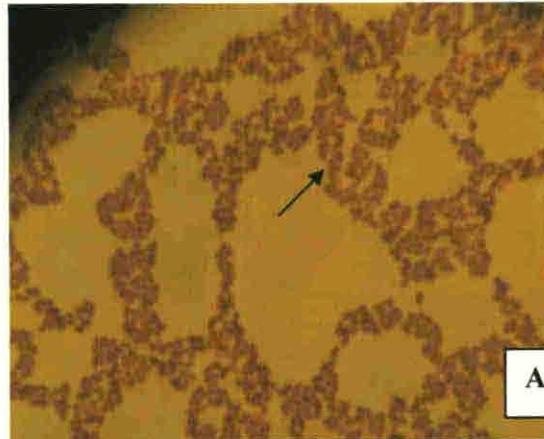


Fig. 27 Gram de *Rhodococcus rhodnii*. Se muestra una colonia joven de cocos Gram positivos. El género *Rhodococcus* presenta un ciclo tipo micelial, el cual cuando es joven son cocos Gram positivos, al alcanzar la fase estacionaria de reproducción son cocos-bacilos y al envejecer, vuelven a ser cocos Gram positivos.

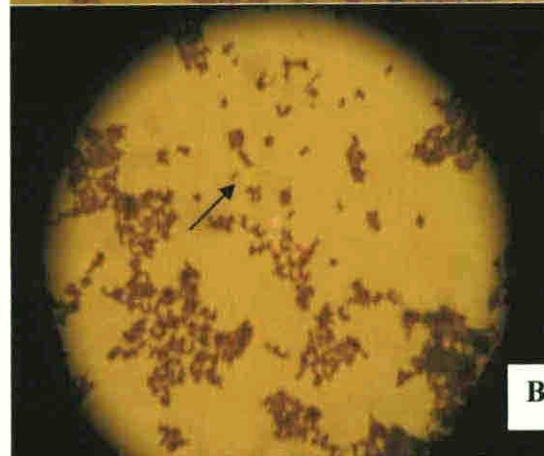


Fig. 28 Gram de *Rhodococcus rhodnii*. Se muestra una colonia en transición de coco a coco-bacilo.

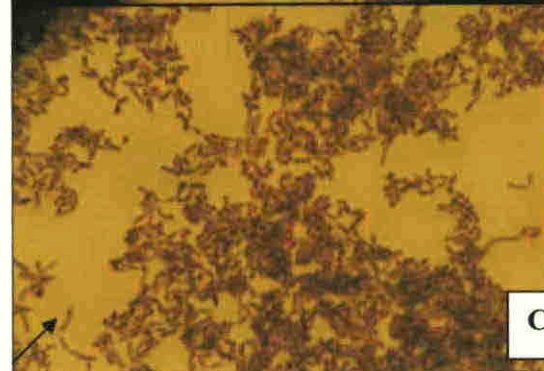


Fig. 29 Gram de *Rhodococcus rhodnii*. Se muestra una morfología de casi bacilos. Es el final de la fase estacionaria. Después vuelven a ser cocos.

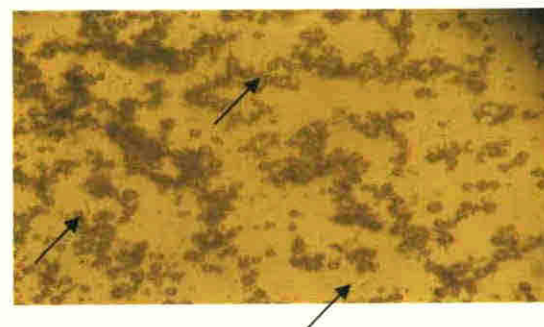


Fig. 30 Un directo de heces de *Rhodnius pallescens*. Se muestra los *Trypanosomas* spp. El índice de infestación encontrado fue de 100%.

4. Pruebas bioquímicas:

A continuación se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en los simbiontes recuperados.

Cuadro N° 10								
Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de la Provincia del Darién y mantenidos en cautiverio por más de 3 generaciones, año 2008								
Pruebas/Cepas	Catalasa	Glucosa	Manitol	Sorbitol	Rhamnosa	Citrato	SIM	Urea
<i>R. rhodnii</i>	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>R. rhodnii</i>	+	+	+	-	-	-	-	+

Las pruebas bioquímicas simples no permiten llevar a cabo una identificación presuntiva de *Rhodococcus spp.*, *Dietzia maris* y *Gordonia spp.*, debido a la gran variedad de resultados que podemos obtener en las reacciones para la utilización de azúcares principalmente. Sin embargo, pueden observarse ciertas tendencias en los *R. rhodnii*, tales como que un 100% son positivos para la urea y no motiles. Como se observa en el cuadro N°10, los azúcares no son utilizados por el 34% de los *R. rhodnii*. La rhamnosa es utilizada por un 10%, mientras que la glucosa y el manitol por el 8%. Es interesante observar que la cepa control de *R. rhodnii* utiliza el manitol. Solamente un 2% utiliza el citrato.

En el cuadro N°11 se puede observar que tanto los *Corynebacterium spp.* y *Gordonia spp.* utilizan los azúcares, sin embargo las *Gordonias spp.* solamente utilizan rhamnosa.

Cuadro N° 11								
Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de El Espino, La Chorrera, Provincia de Panamá y recogidos en su estado silvestre, año 2008								
Pruebas/Cepas	Catalasa	Glucosa	Manitol	Sorbitol	Rhamnosa	Citrato	SIM	Urea
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Gordonia spp.</i>	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>Gordonia spp.</i>	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	-	-	+	-	-	-

En el cuadro N°12 sobresale que los *Corynebacterium spp.* utilizan el citrato, mientras que *Gordonia rubripertinctus*, *Dietzia maris*, *Staphylococcus auricularis* y *Bacillus sphearicus* no lo utilizan. Esta prueba separa a los *Corynebacterium spp* de los demás géneros encontrados.

Cuadro N°12

Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de *Rhodnius pallescens* procedentes de Burunga, Arraiján, Provincia de Panamá y recogidos en su estado silvestre, año 2008

Pruebas/Cepas	Catalasa	Glucosa	Manitol	Sorbitol	Rhamnosa	Citrato	SIM	Urea
<i>Dietzia maris</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Gordonia rubripertinctus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Stapylococcus auricularis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus sphearicus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus sphearicus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium spp.</i>	+	-	-	-	-	+	-	-

En el cuadro N°13, se observa a grande rasgos que *Dietzia maris* no utiliza la urea, mientras que los demás géneros encontrados en esta región si la utilizan. En contraste, es notable que *Dietzia maris* si utilizan la glucosa, mientras que el resto de los géneros: *R. rhodnii* y *Gordonia spp.* no la utilizan.

Cuadro N°13

Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de *Rhodnius pallescens* procedentes de Carriazo, Pacora, Provincia de Panamá y recogidos en su estado silvestre, año 2008

Pruebas/Cepas	Catalasa	Glucosa	Manitol	Sorbitol	Rhamnosa	Citrato	SIM	Urea
<i>Dietzia maris</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Dietzia maris</i>	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>R. rhodnii</i>	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>R. rhodnii</i>	+	-	-	-	+	-	-	+
<i>Gordonia rubripertinctus</i>	+	-	+	+	+	-	-	+
<i>Gordonia spp.</i>	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Gordonia spp.</i>	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>Gordonia spp.</i>	+	-	-	+	+	-	-	+

En el cuadro N°14, podemos observar que dentro del grupo de los *Bacillus sphearicus* recuperados si se pueden obtener reacciones bioquímicas más homogéneas, con la excepción del sorbitol y el citrato para los cuales se presentó variabilidad.

Cuadro N°14								
Pruebas bioquímicas realizadas en simbiontes aislados de <i>Rhodnius pallescens</i> procedentes de Chilibre, Santa Rosa, Provincia de Panamá y recogidos en su estado silvestre, año 2008								
Pruebas/Cepas	Catalasa	Glucosa	Manitol	Sorbitol	Rhamnosa	Citrato	SIM	Urea
<i>Bacillus sphearicus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus sphearicus</i>	-	+	+	-	+	-		-
<i>Bacillus sphearicus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Bacillus sphearicus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>Bacillus sphearicus</i>	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Bacillus sphearicus</i>	-	+	+	-	+	-	-	-

En las figuras 31 al 35 podemos apreciar algunas de las reacciones bioquímicas simples que se realizaron en tubos convencionales y con las cuales se confeccionaron los cuadros arriba expuestos.

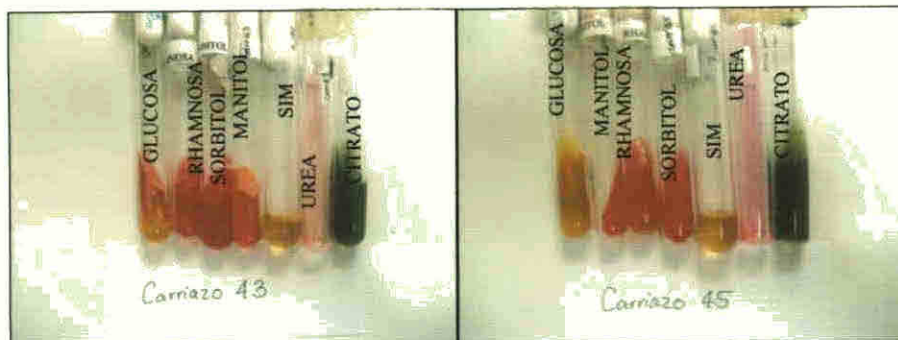


Fig. 31 Pruebas bioquímicas en la cepa Carriazo 43

Fig. 32 Pruebas bioquímicas en la cepa Carriazo 45



Fig. 33 Pruebas bioquímicas en la cepa Burunga 23

Fig. 34 Pruebas bioquímicas en la cepa Carriazo 58

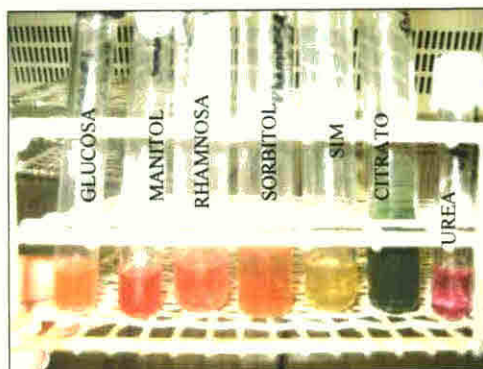


Fig. 35 Pruebas bioquímicas en la cepa control

En el cuadro N 15 se describe el análisis fenotípico de las cepas aisladas de *R. pallescens* en cautiverio provenientes del Darien mediante las pruebas bioquímicas simples mas importantes para la identificación presuntiva. La diferenciación mas importante entre *R. rhodnii* y *Corynebacterium spp* es que los *Corynebacterium spp* son Kinyoun y urea negativos mientras que en *R. rhodnii* son ambos positivos. Al observar una colonia blanca no mucosa con halo digestivo en el medio Rhodococcus debemos orientarnos hacia *Corynebacterium spp* mientras que una colonia seca de color salmon a rosa pálido es indicativo de la presencia de *R. rhodnii*. Exceptuando 6 *R. rhodnii* de los 25 aislados todos fueron glucosa negativos mientras que los *Corynebacterium spp* son todos positivos.

En el cuadro N°16 se describen los rasgos más sobresalientes del análisis fenotípico de las cepas aisladas de *R. rhodnii* procedentes de diferentes áreas de la Provincia de Panama. Las *Gordonias spp*, *Dietzia mans* y *R. rhodnii* son Kinyoun positivos mientras que los *Corynebacterium spp* y los *Bacillus sphearicus* son negativos. Podemos diferenciar a las *Gordonias spp* de las *Dietzia mans* en que las primeras son glucosa negativos y las segundas son positivas. Los *Bacillus sphearicus* se distinguen de los *Corynebacterium spp* en que son catalasa negativos y los segundos son positivos en un 100%. Aplicando estas pruebas bioquímicas simples y observando la morfología de la colonia se puede llegar a una identificación presuntiva.

CUADRO N° 15 ANALISIS FENOTIPICO DE SIMBIOTES AISLADOS DE RHODNIUS PALLESCENS, PROCEDENTES DE LA PROVINCIA DEL DARIEN Y MANTENIDOS EN CAUTIVERIO POR MAS DE 3 GENERACIONES, AÑO 2008							
# CEPAS	MORFOLOGIA	GRAM	KINYOUN	CATALASA	GLUCOSA	UREA	IDENTIFICACION
1	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	+	+	<i>R. rhodnii</i>
2	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
3	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
4	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
5	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
6	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
7	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
8	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
9	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
10	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
11	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
12	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
13	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
14	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
15	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>

# CEPAS	MORFOLOGIA	GRAM	KINYOUN	CATALASA	GLUCOSA	UREA	IDENTIFICACION
16	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
17	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
18	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	+	+	<i>R. rhodnii</i>
19	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
20	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
21	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	+	+	<i>R. rhodnii</i>
25	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
26	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
27	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
28	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	+	+	<i>R. rhodnii</i>
30	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
43	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
45	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
48	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
50	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	+	+	<i>R. rhodnii</i>

CUADRO N° 16 ANALISIS FENOTIPICO DE SIMBIOTES AISLADOS DE RHODNIUS PALLESCENS, PROCEDENTES DE DIFERENTES AREAS DE LA PROVINCIA DE PANAMA, AÑO 2008							
# CEPAS	MORFOLOGIA	GRAM	KINYOUN	CATALASA	GLUCOSA	UREA	IDENTIFICACION
CHO1	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
CHO2	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
CHO3	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
CHO4	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
CHO5	COLONIA ROSA VIEJA Y MUCOSA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>Gordonia spp</i>
CHO6	COLONIA ROSA VIEJA Y MUCOSA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>Gordonia spp</i>
CHO7	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
CHO16	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
BUR23	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	+	-	<i>Dietzia maris</i>
BUR24	COLONIA NARANJA INTENSO MUCOSA	+ (COCOS)	+	+	-	-	<i>Gordonia rubripertinctus</i>
BUR28	COLONIA TRANSPARENTE SEMI-MUCOSA	+ (COCOS)	-	-	+	-	<i>Bacillus sphearicus</i>
BUR30	COLONIA TRANSPARENTE SEMI-MUCOSA	+ (COCOS)	-	-	+	-	<i>Bacillus sphearicus</i>
BUR52	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>
BUR53	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCOS)	-	+	+	-	<i>Corynebacterium spp</i>

# CEPAS	MORFOLOGIA	GRAM	KINYOUN	CATALASA	GLUCOSA	UREA	IDENTIFICACION
BUR56	COLONIA BLANCA NO MUCOSA CON HALO DIGESTIVO EN EL MEDIO	+ (COCO-BACILOS PLEOMORFICOS)	-	+	-	-	<i>Corynebacterium spp</i>
CAR37	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	+	-	<i>Dietzia maris</i>
CAR39	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	+	-	<i>Dietzia maris</i>
CAR43	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	+	+	<i>R. rhodnii</i>
CAR44	COLOR SALMON A ROSA PALIDO, SECA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>R. rhodnii</i>
CAR45	COLONIA NARANJA INTENSO MUCOSA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>Gordonia rubripertinctus</i>
CAR58	COLONIA ROSA VIEJA Y MUCOSA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>Gordonia spp</i>
CAR61	COLONIA ROSA VIEJA Y MUCOSA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>Gordonia spp</i>
CAR63	COLONIA ROSA VIEJA Y MUCOSA	+ (COCOS)	+	+	-	+	<i>Gordonia spp</i>
CHI46	COLONIA TRANSPARENTE SEMI-MUCOSA	+ (BACILOS)	-	-	+	-	<i>Bacillus sphearicus</i>
CHI47	COLONIA TRANSPARENTE SEMI-MUCOSA	+ (BACILOS)	-	-	+	-	<i>Bacillus sphearicus</i>
CHI48	COLONIA TRANSPARENTE SEMI-MUCOSA	+ (BACILOS)	-	-	+	-	<i>Bacillus sphearicus</i>
CHI49	COLONIA TRANSPARENTE SEMI-MUCOSA	+ (BACILOS)	-	-	+	-	<i>Bacillus sphearicus</i>
CHI50	COLONIA TRANSPARENTE SEMI-MUCOSA	+ (BACILOS)	-	-	+	-	<i>Bacillus sphearicus</i>
CHI51	COLONIA TRANSPARENTE MUCOSA	+ (BACILOS)	-	-	+	-	<i>Bacillus sphearicus</i>

5 Patrones de restriccion diferencial encontrados en este estudio

Utilizando el marcador 1Kb Ladder se pudo determinar la longitud de los pares de bases que revelaron las bandas del patron de restriccion diferencial. Para todas las colonias se aplicó el mismo orden de las enzimas de restriccción así: *Pst I* / *Hind III* / *BAM HI* / *Eco RI* y *Kpn I*. En las figuras 37, 38, 39 y 40 se observa que las enzimas *Pst I*, *Hind III* y *Bam HI* varían entre las diferentes especies de *Gordonia spp*. Las enzimas *Eco RI* y *Kpn I* se mantuvieron estables en este grupo.

En la figura 42 se muestra el patrón de restriccion diferencial de las cepas control de *R. rhodnii*. En base a este dato se pudieron determinar dos variaciones de *R. rhodnii* marcadas claramente por la enzima *Kpn I*, que en el caso de la variación 2 de *R. rhodnii* no presenta la banda de 450 pb (Observar figura 41 y 43).

En el caso de *Dietzia maris* su patron de restriccion diferencial se presenta muy similar al de *R. rhodnii*, solamente la enzima *Pst I* lo diferencia con la aparición de bandas con 1000 pb y 450 pb.

Para los *Corynebacterium spp* se observamos dos especies diferentes por su variación en las enzimas *Pst I* y *Hind III*. Las enzimas *BAM III*, *Eco RI* y *Kpn I* se mantuvieron estables entre las dos especies de *Corynebacterium spp* recuperadas. Observar figuras 44 y 45.

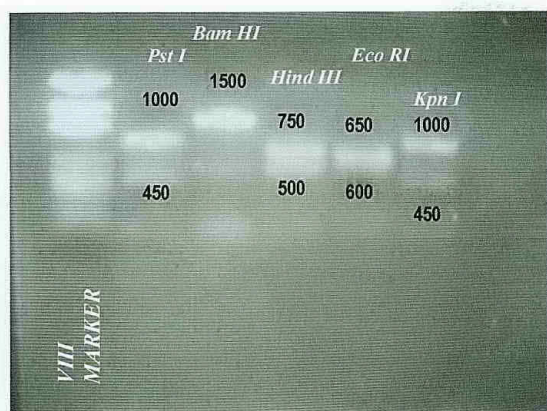


Fig. 36 PCR-RFLP de *Dietzia maris*

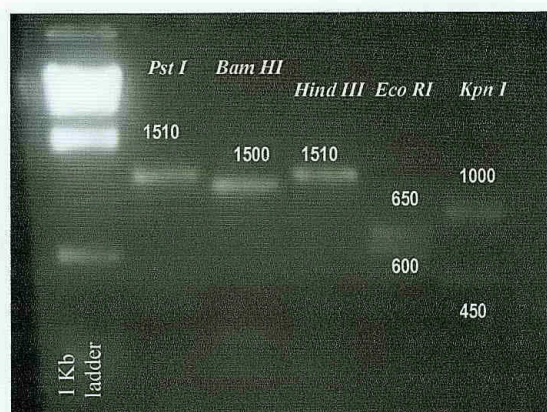


Fig. 37 PCR-RFLP de *Gordonia rubripertinctus*

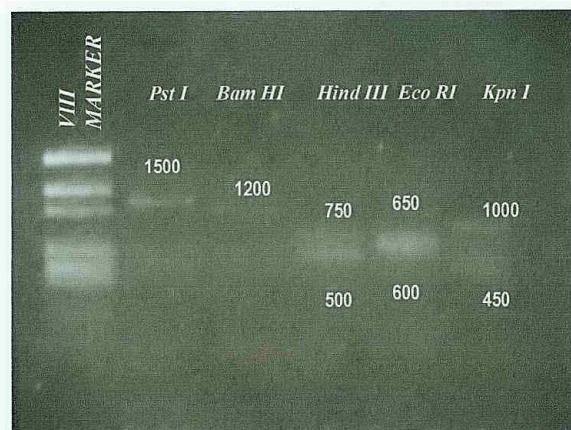


Fig. 38 PCR-RFLP de *Gordonia* spp.

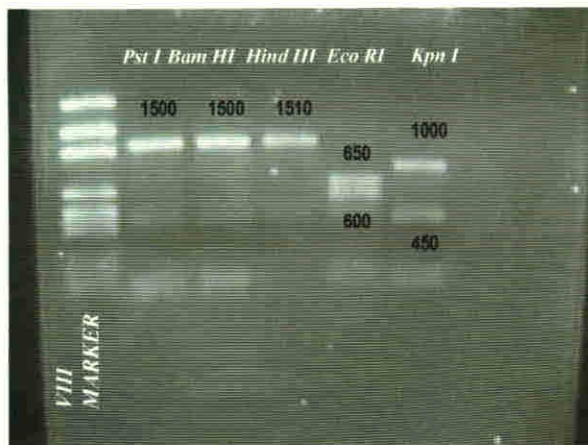


Fig. 39 PCR-RFLP de *Gordonia* spp.

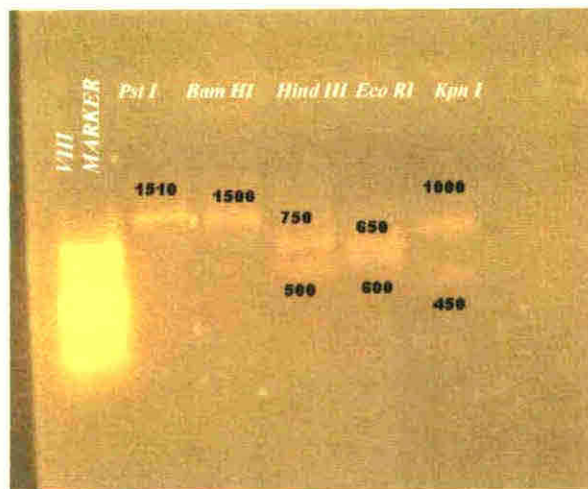


Fig. 40 PCR-RFLP de *Gordonia* spp.

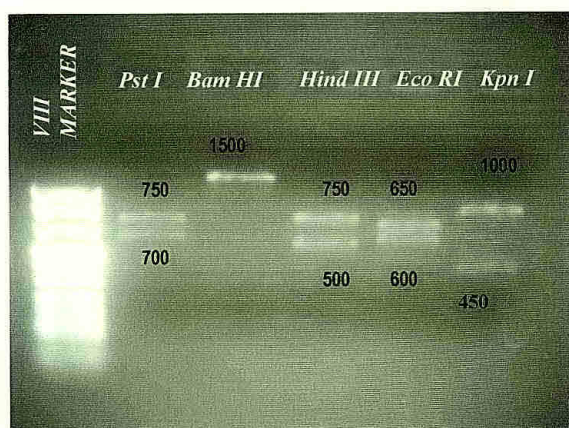


Fig. 41 PCR-RFLP de *Rhodococcus rhodnii* var1

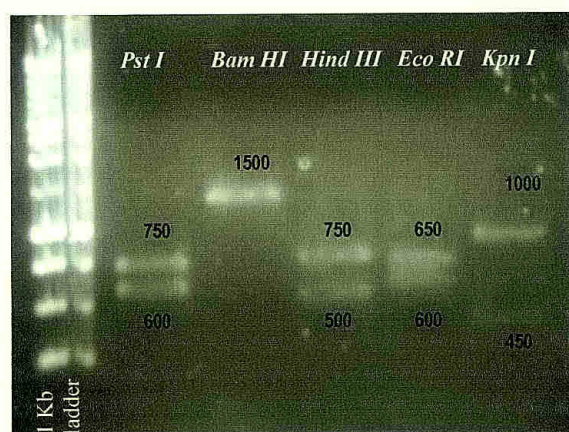


Fig. 42 PCR-RFLP de *Rhodococcus rhodnii*,
Cepa control.

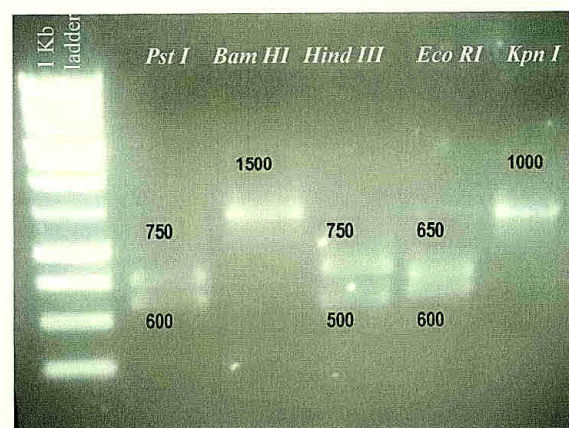


Fig. 43 PCR-RFLP de *Rhodococcus rhodnii* var2

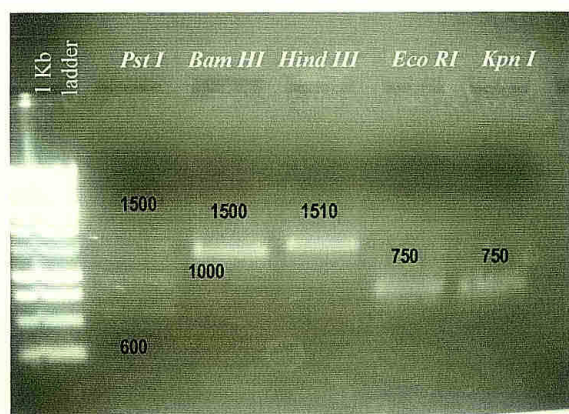


Fig. 44 PCR-RFLP de *Corynebacterium* spp.

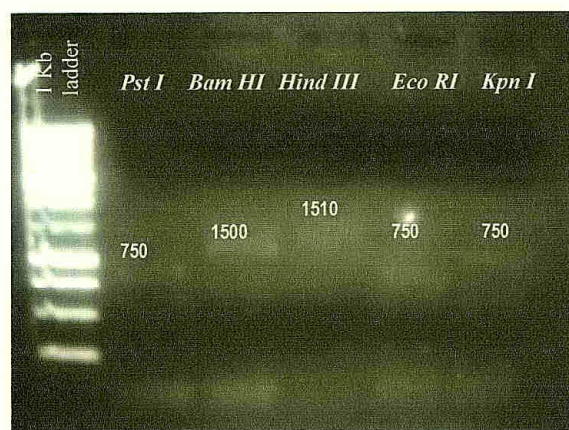


Fig. 45 PCR-RFLP de *Corynebacterium* spp.

Para la extracción de ADN de las cepas aisladas de los *Rhodnius pallescens*, se probaron 2 métodos:



Fig. 46 Método *Rhodococcus*

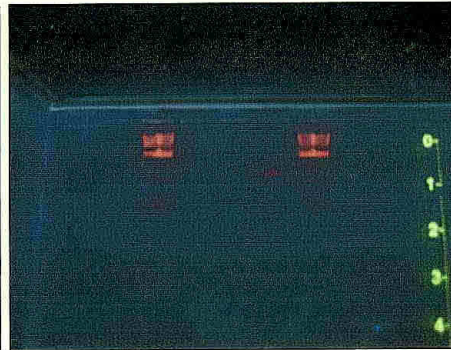


Fig. 47 Método *Nocardia*

Con el método de extracción de *Rhodococcus* se consigue una mejor visualización del ADN en el gel que con el método *Nocardia*; sin embargo, con ambos métodos se consiguen buenas amplificaciones de ADN. El método *Rhodococcus* es un método orgánico, que involucra una lista larga de pasos y se realiza en alrededor de 4 horas. El método *Nocardia* es un método inorgánico que utiliza una solución chelex en la cual se resuspende la colonia y se hierve por 30 minutos, luego se centrifuga por 8 minutos a 5,000 rpm. Se obtiene ADN en menos de 1 hora. Se recomienda para la extracción de ADN de *Rhodococcus*, el método inorgánico *Nocardia*. (Laurent et. al., 1998)

CUADRO N° 17
PATRON DE RESTRICCIÓN DIFERENCIAL
CEPAS EN CAUTIVERIO (COLONIA)

Colonia	ENZIMAS (bandas en pb) *Marcador1Kb Ladder					Resultados
	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III	<i>BAM</i> HI	<i>Eco</i> RI	<i>Kpn</i> I	
1	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>
2	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
3	1500 1000 600	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
4	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>
5	750	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
6	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>
7	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>
8	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
9	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
10	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
11	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
12	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
13	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
14	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
15	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
16	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
17	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
18	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
19	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>
20	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>
21	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>

25	750	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium spp.</i>
26	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>
27	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>
28	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
30	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
43	750	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium spp.</i>
45	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
48	750	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium spp.</i>
50	750 600	1500	750 500	650 600	1000	<i>R. rhodnii</i>

En el cuadro N°17 puede observarse los diferentes patrones de restricción diferencial de los simbiontes aislados de los *Rhodnius pallescens* mantenidos en cautiverio. Según el orden de procesamiento de los aislamientos recuperados, a las colonias se les iba asignando un número. Así entonces, aparece resaltado en rojo, las cepas de *R. rhodnii* que presentaron la variación 2, entre ellos, colonias 1,4,6,7,19,20,26,27 y 50; que representa el 30% de los simbiontes aislados de *R. pallescens* en cautiverio. En verde, se resaltan las dos especies de *Corynebacterium spp.* encontrados. Obsérvese que de este conjunto, solamente 3 colonias presentan la enzima *Pst I* un patrón de bandas dramáticamente diferente, con 1,500, 1000 y 600 pb. Las colonias de *Corynebacterium spp.* están designadas por los números 3,5,25,43 y 48; representando el 16% de los aislamientos de los triatomíneos en cautiverio. Así pues, también puede observarse que la variación 1 de *R. rhodnii* es la que

prevalece en esta población de triatominos, ya que representa un 53% del total de los aislamientos.

CUADRO N° 18 PATRON DE RESTRICCIÓN DIFERENCIAL CEPAS EN LIBERTAD (CAMPO)						
Colonia	ENZIMAS (bandas en pb) *Marcador1Kb Ladder					Resultados
	<i>Pst I</i>	<i>Hind III</i>	<i>BAM HI</i>	<i>Eco RI</i>	<i>KpnI</i>	
CHO1	1500 1000 600	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
CHO2	1500 1000 600	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
CHO3	1500 1000 600	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
CHO4	1500 1000 600	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
CHO5	1510	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>Gordonia</i> <i>spp.</i>
CHO6	1510	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>Gordonia</i> <i>spp.</i>
CHO7	1500 1000 600	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
CHO16	1500 1000 600	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
BUR23	1000 450	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>Dietza maris</i>
BUR24	1510	1500	1510	650 600	1000 450	<i>Gordonia</i> <i>rubripertinctus</i>
BUR28	No se obtuvo amplificación de ADN con los primers para <i>Rhodococcus</i>					<i>Bacillus</i> <i>Sphearicus</i>
BUR30	No se obtuvo amplificación de ADN con los primers para <i>Rhodococcus</i>					<i>Bacillus</i> <i>Sphearicus</i>
BUR52	750	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
BUR53	750	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i> <i>spp.</i>
BUR56	750	1500	1510	750	750	<i>Corynebacterium</i>
CAR37	1000 450	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>Dietza maris</i>

CAR39	1000 450	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>Dietzia maris</i>
CAR43	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
CAR44	750 600	1500	750 500	650 600	1000 450	<i>R. rhodnii</i>
CAR45	1510	1500	1510	650 600	1000 450	<i>Gordonia Rubripertinctus</i>
CAR58	1500	1200	750 500	650 600	1000 450	<i>Gordonia spp.</i>
CAR61	1500	1200	750 500	650 600	1000 450	<i>Gordonia spp.</i>
CAR63	1500	1500	1510	650 600	1000 450	<i>Gordonia spp.</i>
CHI46	No se obtuvo amplificación de ADN con los primers para <i>Rhodococcus</i>					<i>Bacillus Sphearicus</i>
CHI47	No se obtuvo amplificación de ADN con los primers para <i>Rhodococcus</i>					<i>Bacillus Sphearicus</i>
CHI48	No se obtuvo amplificación de ADN con los primers para <i>Rhodococcus</i>					<i>Bacillus Sphearicus</i>
CHI49	No se obtuvo amplificación de ADN con los primers para <i>Rhodococcus</i>					<i>Bacillus Sphearicus</i>
CHI50	No se obtuvo amplificación de ADN con los primers para <i>Rhodococcus</i>					<i>Bacillus Sphearicus</i>
CHI51	No se obtuvo amplificación de ADN con los primers para <i>Rhodococcus</i>					<i>Bacillus Sphearicus</i>

El cuadro N°18 representa los patrones de restricción diferencial de las cepas aisladas de los *R. pallescens* encontrados en la naturaleza de la Provincia de Panamá. Según lugar de recolección, al grupo de colonias recuperadas se les asignó un conjunto de tres letras que representa su origen, seguido por un número. Así, pues, observamos que el conjunto CHO (Chorrera), en el que 6 de 8 simbioses pertenecen al género *Corynebacterium spp.* Su patrón de restricción diferencial es idéntico al encontrado en la cepa 3 de los triatomos en cautiverio. (Resaltado en verde). Su patrón de PCR-RFLP se ilustra en la figura 45. Los otros 2 simbioses, dentro de este grupo, pertenecen al género *Gordonia*

spp (resaltado en amarillo) y cuyo patron de restriccion se observa en la figura 40

Dentro del conjunto de los BUR (Burunga) hay una gran variabilidad de simbiontes entre ellos *Dietzia maris* (resaltado en rosado) *Gordonia rubripertinctus* (amarillo) *Corynebacterium spp* (verde) y *B. sphearicus*. A diferencia de los CHO en BUR el patron diferencial de los *Corynebacterium spp* es idéntico al encontrado en las cepas 5 25 43 y 48 de *R. pallescens* en cautiverio

En Carriazo (CAR) se han encontrado 3 especies de *Gordonia spp* (resaltado en amarillo) 2 *R. rhodnii* var 1 y 2 *Dietzia maris* (rosado)

Finalmente en Chilibre (CHI) se encontraron *Bacillus sphearicus* pero no se pudieron obtener patrones de restriccion diferencial con los primers para *Rhodococcus spp*

DISCUSION

Se confirma nuevamente que *Rhodnius pallescens* es peridomiciliar ya que las palmas cercanas a las viviendas son las que albergaban mayor numero de triatomínos (Zapata 1999 y Ortega Barria 2002) El hecho de que durante la época seca la colecta de triatomínos fue mas efectiva en comparación con la epoca lluviosa sugiere que el ambiente humedo no favorece la colecta de estos insectos

En cuanto al sexo de los *Rhodnius pallescens* los resultados señalan que hay una prevalencia del simbrionte *R rhodnii* en los triatomínos del sexo femenino Como el sexo masculino tiene una frecuencia de aparición mas baja la recuperación de *R rhodnii* en machos se reduce a la mitad En esta investigación se desarrollo un medio de cultivo mas apropiado para la recuperación de *Rhodococcus spp* ya que el agar sangre y caldo BHI sugeridos por Sellon 2000 no son tan efectivos como el medio propuesto en este trabajo en el cual no se utiliza sangre sino extracto de malta extracto de levadura sales carbonatadas y glucosa El color salmon desarrollado por las colonias de *Rhodococcus* y el naranja intenso de *Gordonia rubripertinctus* fueron clave para la identificación presuntiva Cabe senalar que el medio indicado es ademas efectivo para el aislamiento de Actinomycetes ya que es facil de preparar y no se descompone facilmente

La tinción de Gram fue de utilidad parcial para la identificación presuntiva en el sentido que se esperaban cocos Gram positivos sin embargo la clave fundamental fue la tinción de Kinyoun modificada ya que esta es específica para los microorganismos ácidos resistentes débiles. Cabe señalar que *Rhodococcus*, *Gordonia* y *Dietzia* son negativos por BAAR en la tinción de Ziehl Neelsen y por lo tanto ésta no es útil en la distinción de las especies mencionadas.

En coincidencia a lo reportado por Weissfeld *et al* 1998 a través de la tinción de Gram se pudo observar variabilidad morfológica de *Rhodococcus* la cual puede consistir en cocos Gram positivos, coco bacilos en fase estacionaria y cocos Gram positivos nuevamente en la fase final de la curva de crecimiento bacteriano.

El estudio de reacciones bioquímicas ha sido reportado escasamente. Según el *Clinical Microbiology Procedures Handbook* de Isenberg 2004 se han reportado ciertas tendencias pero existen discrepancias en cuanto a los resultados encontrados en este trabajo. A grandes rasgos podemos utilizar las pruebas bioquímicas como una guía en esta población de simbioses pero no son definitivas para una identificación presuntiva de las diferentes especies. Sellon 2000, Soto 1994 y Pavia 2005 han sugerido las técnicas moleculares.

R. rhodnii no es el único simbiote encontrado en *R. pallescens*. A través de esta investigación se detectó además la

presencia de *Corynebacterium spp* *Gordonia spp* *Dietzia maris* y *Bacillus sphearicus* como simbioses y cuya función en *R pallescens* esta por descubrirse a traves de futuros estudios Hay que recalcar que en la actualidad solamente se han reportado 13 aislamientos de *D maris* segun Rainey 1995 y en este estudio se han reportado 3 como simbioses de *R pallescens*

Pavia 2005 y Rodriguez 2004 encontraron simbioses como *Serratia marscecens* *P aeruginosa* y *Corynebacterium spp* ademas de *R rhodnii* pero en *Rhodnius prolixus*

Cabe destacar que la tecnica PCR RFLP logra distinguir patrones de subespecie de *Rhodococcus rhodnii* Estas variaciones son determinadas por la enzima de restriccion *KpnI* de la cual se obtiene bandas como 1000pb en una subespecie y 1000 pb y 450 pb en la otra La enzima de restriccion *PstI* determina la especie dentro de los actinomicetes En el género *Rhodococcus* las enzimas de restriccion *Hind III* *BAM HI* y *Eco RI* se mantienen constantes en su patrón diferencial Maier (2000) y Ronald (1993) han sugerido que el efecto de factores ambientales ha dado como resultado una leve mutacion un cambio de una base una insercion delección ó substitucion produciendo variaciones en los sitios de restriccion

Existen otras bacterias que no pertenecen a la familia de los actinomicetes que tambien ejercen un papel de simbiote dentro de *Rhodnius pallescens* por lo que *Rhodococcus rhodnii* no es un simbiote obligatorio del mismo pero es altamente

definido dentro de los especímenes de colonia y es transmitido eficazmente por medio de la coprofagia de forma vertical en contraste con los hallazgos de Baines (1956) en los que *Rhodococcus rhodnii* se encuentra en forma constante y obligatoria pero en *Rhodnius prolixus*

Diferentes regiones dentro de la Provincia de Panamá están colonizadas por *Rhodnius pallescens* siendo todas positivas en el examen directo en heces por *Trypanosoma cruzi* sin embargo cada grupo dentro de su región posee un simbionte característico. Por lo tanto la presencia de uno u otro simbionte parece obedecer la característica de una región determinada. Este factor no ha sido reportado anteriormente.

Cada triatómino al parecer posee un solo simbionte a la vez sin embargo puede haber crecimiento de diversas bacterias cuyo rol está por determinarse.

Dietzia maris está filogenéticamente muy próxima a *Rhodococcus rhodnii* en el patrón de restricción diferencial solamente difieren en los cortes de la enzima de restricción *PstI* siendo *Rhodococcus rhodnii* en sus cortes con esta enzima en 750pb y 600pb mientras que con *Dietzia maris* es entre 1000pb y 450pb. Morfológicamente las colonias son idénticas a *Rhodococcus rhodnii* pero los patrones de las pruebas bioquímicas son diferentes así como su patrón diferencial molecular.

Para observar un patrón diferencial visible o suficientemente distinguible en la técnica de PCR RFLP las especies de *Corynebacterium* requieren un tiempo de incubación con la enzima de restricción de máximo 1 hora y 30 minutos en contraste con las especies de *Rhodococcus* *Gordonia* y *Dietzia* cuyo tiempo es de 4 horas. Esta diferencia debe a que el ADN de estas especies requieren un tiempo de digestión más prolongado en las enzimas de restricción.

Es interesante observar que se detectaron 4 diferentes patrones de restricción diferencial para *Gordonia* spp. De acuerdo con la morfología de la colonia y pigmentos desarrollados se marcan diferencias bien establecidas. Por ejemplo la *Gordonia* spp (CAR63) presenta un color mostaza y textura mucosa mientras que la *Gordonia* spp (CAR58 y CAR 61) presenta un color rosa viejo y su textura es sumamente mucosa. Falta por investigar el papel de este conjunto de *Gordonias* spp dentro de *Rhodnius pallescens*. Cabe destacar que la mayoría de las *Gordonias* spp fueron aisladas de triatominos que habitan la región de Pacora, solamente dos triatominos se encontraron en Chorrera.

Se puede apreciar el hallazgo de dos patrones de restricción diferencial del género *Corynebacterium* spp. Se aislaron 9 *Corynebacterium* spp entre las regiones de Chorrera y Burunga. Cabe señalar que los *Corynebacterium* spp de Chorrera tienen un patrón diferente a los de Burunga. Sin embargo, dentro

de los que se encontraban en cautiverio se observan ambos patrones. Este hallazgo parece confirmar la hipótesis de que los simbioses son regionales.

El aislamiento de los *Bacillus sphearicus* fue inesperado. En su mayoría provienen de Chilibre. Con los cebadores diseñados para *Rhodococcus rhodnii* no se logró su amplificación de ADN, por lo tanto, para su identificación final fueron secuenciados en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, España. También se confirmó mediante una secuenciación la identificación de *Dietzia maris* y las *Gordonias spp*, ya que el único patrón de PCR-RFLP conocido era el de *Rhodococcus rhodnii* a través de su cepa control.

Para finalizar en este trabajo se elaboró un nuevo medio de cultivo para el crecimiento de *Rhodococcus spp*. Se encontró a *Rhodococcus rhodnii* por primera vez en *Rhodnius pallescens* procedentes de la Provincia del Darién y del Distrito de Pacora, Provincia de Panamá, y se detectaron nuevos patrones de restricción diferencial para las especies encontradas.

CONCLUSION

Se comprobó la presencia de *Rhodococcus rhodnii* en *Rhodnius pallescens* de Panamá

Los simbioses aislados en esta población de estudio presentan regionalismo por lo que la prevalencia de *R. rhodnii* parece depender del sitio de aislamiento. *R. rhodnii* fue recuperado con una incidencia de 83% de los triatomíneos procedentes del Darién.

El 98% de los *Rhodnius pallescens* recuperados de campo estaban infectados con *Trypanosoma cruzi*.

Rhodococcus rhodnii no es un simbiote obligatorio de *Rhodnius pallescens* ya que existen otros simbioses como *Gordonia spp*, *Dietzia maris* y *Corynebacterium spp* que pueden estar presentes en vez de *Rhodococcus rhodnii* y llevar a cabo su papel de simbiote.

La identificación morfológica de la colonia (colonia seca color salmón) depende del tipo de medio de cultivo utilizado. El medio Rhodococcus permite el reconocimiento presuntivo de *Rhodococcus spp*.

La tinción de Gram (cocos Gram positivos) y Kinyoun modificada positiva, en adición con una prueba de urea positiva de *Rhodococcus spp*, son útiles también para la identificación presuntiva.

Se comprobó que el uso de pruebas bioquímicas no es de utilidad ya que se obtienen una gran variabilidad de resultados

Para la lisis y recuperación de ADN tanto el método convencional y el que utiliza solución chelex son eficaces para la obtención de ADN. La pared celular de *Rhodococcus spp* contiene ácidos micólicos por lo que su lisis celular es más difícil. El uso de la solución chelex acorta el tiempo para la extracción de ADN por su acción sobre los ácidos micólicos.

La técnica de PCR RFLP con lo que se confirma el género *Rhodococcus* logrando separarlo de los géneros *Gordonia spp*, *Dietzia spp* y *Corynebacterium spp*.

El conjunto de enzimas utilizadas *Pst I*, *Hind III*, *BAM HI*, *Eco RI* y *Kpn I* permite distinguir patrones de subespecies de *Rhodococcus rhodnii*. Especialmente la enzima *kpn I* que nos muestra dos posibles variaciones de *Rhodococcus rhodnii* en nuestro medio.

Se puede concluir que para los géneros *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia* y *Corynebacterium* la técnica de PCR RFLP es una herramienta útil, rápida y económica que puede efectuarse para la identificación final de estos microorganismos.

RECOMENDACIONES

- 1 Determinar si los simbiontes distintos a *Rhodococcus rhodnii* son capaces de facilitar el desarrollo de la ninfa de *Rhodnius pallescens* por si solos
- 2 Determinar los simbiontes y la regionalidad con los que encuentran en los géneros *Triatoma* *Panstrongylus* y su relacion con los simbiontes del genero *Rhodnius*
- 3 Se sugiere realizar en futuros estudios una modificación genetica de *Rhodococcus Gordonia* y *Dietzia* para determinar si los tres son efectivos como control biologico del *Trypanosoma cruzi* en nuestro medio Una vez modificado genéticamente un grupo de simbiontes y colocados adecuadamente dentro de *Rhodnius pallescens* podrian ser monitoreados en el ambiente por genes indicadores para dar seguimiento de su ciclo ecologico y dispersión en el medio ambiente
- 4 Determinar si los pigmentos producidos por los simbiontes recuperados en este estudio principalmente *Rhodococcus rhodnii* tienen actividad citolitica contra el *Trypanosoma cruzi*

BIBLIOGRAFIA

- Anderson J Cordon Rosales C Durvasula R Beard C B y Doston E M 2004 Abstract Annual meeting of the American Society for Microbiology May 23 27 New Orleans
- Arenskotter M Broker D y Steinbuchel A 2004 Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia* Appl and Environ Microbiol 70 3 195 3 204
- Baines S 1956 The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) J Exp Biol 1 533 541
- Baumann P Baumann L Lai C y Rouhbksh D 1995 Genetics Physiology and Evolutionary Relationships of the Genus *Buchnera* intracellular symbionts of the aphids Annu Rev Microbiol 49 55 94
- Beard Ch Durvasula R Richards F 1998 Bacterial symbiosis in Arthropods and the Control of Disease Transmission Emerg Infect Dis 4 581 591
- Beard Ch Mason P Aksoy S Tesh R y Richards F 1992 Transformation of an Insect Symbiont and Expression of a Foreign Gene in the Chagas Disease Vector *Rhodnius prolixus* Am J Trop Med Hyg 46(2) 195-200
- Bell K Philip J Aw D y Christofi N 1998 The genus *Rhodococcus* J of Appl Microbiol 85 195 210
- Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories** 1993 Atlanta (GA) Centers for Disease Control and Prevention 4 1 133
- Boete Ch 2007 **Genetically Modified Mosquitoes for Malaria Control** Ed Kurekah 6 320 325
- Bourtiz K Miller T 2006 **Insect Symbiosis** Ed CRC Press 6 83 93
- Buchner P 1965 **Endosymbionts of animals with plant microorganism** Ed Interscience 6 365-375
- Butler W Kilburn J Kubica G 1987 High Performance Liquid Chromatography Analysis of Mycolic Acids as an aid in Laboratory identification of *Rhodococcus* and *Nocardia* Species J of Clin Microbiol 25 2 126-2 131
- Correa M Yousten A 2001 **Growth and potential for Conjugation by *Bacillus spheareus* in mosquito larval cadavers** Microbiology and Immunology Section Biology Department Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg VA U S A pp 456 500
- Doston E Plykatis B Shinnick T y Beard C 2003 Transformation of *Rhodococcus rhodni* a symbiont of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* with integrative elements of the L1 mycobacteriophage Infect Genet and Evol 3 103 109
- Durvasula R Gumbs A Panackal A Kruglov A Askoy S Merrifield R Richard F y Beard C 1997 Prevention of insect borne disease An approach using transgenic symbiotic bacteria The Nat Acad Sci 94 3274-3278

Espino C Gómez T Gonzalez G Brazil do Santos M Solano J Sousa O Moreno N Windsor D Ying A Vilchez S y Osuna A 2007 Detection of Wolbachia Bacteria in Multiple Organs and Faces of the Triatomine Insect *R. pallescens* (Hemiptera Reduviidae) Appl Environ Microbiol 75 547 550

Glickman S E Kilburn J O Butler W R y Ramos L S 1994 Rapid Identification of Mycolic Acid Patterns of Mycobacteria by High Performance liquid chromatography using pattern recognition software and *Mycobacterium* library J of Clin Microbiol 32 740 745

Goodfellow M Chun J Stackebrandt E y Kroppenstedt R 2002 Transfer of *Tsukamurella wratislaviensis* Goodfellow et al 1995 to the genus *Rhodococcus* as *Rhodococcus wratislaviensis* comb nov Int J of Syst and Evolution Microbiol 52 749 755

Hill P 1976 *Rhodnius prolixus* and its symbiotic Actinomycete a Microbiological Physiological and Behavioural Study Proc R Soc Lond 194 501 525

Hypsa V y Dale C 1997 In Vitro Culture and Phylogenetic Analysis of *Candidatus Arsenophonus triatominarum* an intracellular Bacterium from the Triatomine Bug *Triatoma infestans* Int J of Syst Bacteriol 47 1 140-1 144

Isenberg H 2004 **Clinical Microbiology Procedures Handbook** 2nd Edition ASM Press 6 6 2 7

Kinyoun J J 1915 A note on Uhlenhuths Method for Sputum Examination for Tubercle Bacilli Am J Pub Health 5 867 870

Klatte S Kroppenstedt R y Rainey F 1994 *Rhodococcus opacus* sp nov an unusually nutritionally versatile Rhodococcus species Syst and Appl Microbiol 17 355 360

Laurent F Provost F Boiron P 1998 Rapid Identification of Clinically Relevant *Nocardia* Species to Genus Level by 16SrRNA Gene PCR J of Clin Microbiol 37 99 102

Maier R Pepper I y Gerba Ch 2000 **Environmental Microbiology** Ed Academic Press 13 304 309

Manual Difco 1984 **Medios de cultivo deshidratados y reactivos para Microbiología** Decima edición Difco Laboratorios pp 141 1044

McLeod M Warren L Hsiao W y Araki N 2006 The complete genome of *Rhodococcus* sp RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse PNAS 103 15 582 15 587

Ortega Barria 2002 **La palmera *Attalea butyracea* como un marcador eco epidemiológico de riesgo para la enfermedad de Chagas en Panamá OPS Taller Técnico de Estudios sobre *Rhodnius pallescens*, su Vigilancia y Control** pp 24 25

Okami Y Arima Sh Suzuki M 1963 Influence of Agar on the Morphology and Pigmentation of Streptomycetes National Institute of Health, Sinagawa ku, Tokio, Japan 11 493-497

Pavia P Calderon C Puerta C 2005 Diferenciación de especies de *Rhodococcus* mediante una prueba de PCR RFLP basada en los genes codificantes para la subunidad 16S ribosomal Nova Publicacion Cientifica 3 14 20

Pidoux O Argenston N Jacomo V y Drancourt M 2001 Molecular Identification of a *Dietzia maris* Hip Prosthesis Infection Isolate J Clin Microbiol 39(7) 2 634 2 636

Puente P E 2007 Caracterización química y determinación de la actividad antimicrobiana de pigmentos obtenidos desde cepas del genero *Chromobacterium* Tesis de Grado Universidad Austral, Colombia pp 13 18

Rainey F Klatte S Kroppenstedt R y Stackebrandt E 1995 *Dietzia* a New Genus including *Dietzia maris* comb nov formerly *Rhodococcus maris* Int J of Syst Bacteriol 45 32 36

Rodriguez J Pavia P y Calderon C 2004 Estandarización de una prueba de PCR RFLP para la identificación de *R rhodni* en insectos triatomos Universitas Scientiarum 12 11 22

Ronald A and Richard B 1993 **Microbial Ecology Fundamental and Applications** Ed The Benjamin/Cummings Publishing Company pp 233 235

Schofield C J 1997 **Biología y Control de *Rhodnius pallescens*** OPS Taller Tecnico de Estudios sobre *Rhodnius pallescens*, su Vigilancia y Control pp 11

Stackebrandt E Rainey F y Ward Rainey N 1997 Proposal for a New hierarchic classification system Actinobacteria classis nov Int J Syst Bacteriol 47 479-491

Sellon D Besser T y McConnico R 2000 Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals PCR or culture? AAEP 46 268 269

Soto A Zapardiel J and Soriano F 1994 Evaluation of API Coryne System for identifying coryneform bacteria J of Clin Pathology 47 756-759

Thiery I Hamon S Delecluse A y Orduz S 1998 "The Introduction into *Bacillus sphearicus* of the *Bacillus thuringiensis* subs medellin cyt1Ab1 Gene Results in Higher Susceptibility of Resistant Mosquito Larva Populations to *B sphearicus* Appl Environ Microbiol 64(10) 3 910 3 916

Treadway S Yanagimachi L Lessard P Stephanopoulos G y Sinskey A 1999 Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24 Appl Microbiol Biotechnol 51(6) 786-793

Van der Geize R y Dijkhuizen L 2004 Hanessing the catabolic Diversity of *Rhodococci* for Environmental and Biotechnological Applications Microbiology 7 255 261

Veiga Crespo P Blasco L Rosa dos Santos F Poza M y Villa T 2005 Influence of Culture conditions of *Gordonia jacobea* MV 26 on canthaxanthin production Int Microbiol 8 55 58

Weissfeld A Sahm D y Forbes B 1998 **Bailey and Scott Diagnostic Microbiology** 10th edition Mosby 673 675

Zapata J Arauz Y De Turner A De Obaldia G y Adames E 1999 Ciclo y Expectativa de vida de *Rhodnius pallescens* Barber 1932 (Reduviidae Triatominae) bajo condiciones de laboratorio Scientia(Panamá) 14 N 2 49 64

Zeledon R E Marin F Calvo N Lugo E y Valle S 2006 Distribution and Ecological aspects of *Rhodnius pallescens* in Costa Rica and Nicaragua and their epidemiological implications Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 10(1) 75 79

ANEXO
PREPARACIÓN DE REACTIVOS TINTES
Y MEDIOS

MEDIOS UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE
RHODOCOCCLUS

1 Medio *Rhodococcus*

Extracto de malta	10 g
Extracto de levadura	4 g
Carbonato de calcio	2 g
Glucosa	4 g
Agar base	16.5 g
Agua destilada	1 000 ml

2 Medio Agar Sangre

Peptona	15 g
Extracto de hígado	2.5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro sodico	5 g
Agar base	12 g

3 Medio BHI líquido

Infusión de cerebro ternera	200 g
Infusión de corazón de vacuno	250 g
Peptona	10 g

Dextrosa	2 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	2 5 g

Todos con pH final de 7 4 +/- 0 2

MEDIOS UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACION

PRESUNTIVA DE *RHODOCOCCLUS*

1 Urea

Extracto de levadura	0 1 g
Fosfato potásico monobásico	9 1 g
Fosfato potásico dibásico	9 5 g
Urea	20 g
Rojo fenol	0 01 g

2 SIM

Peptona	30 g
Extracto de carne	3 g
Hierro peptonizado	0 2 g
Tiosulfato sódico	0 025 g
Agar base	3 g

3 Citrato

Sulfato de magnesio	0 2 g
Fosfato dihidrogeno amónico	1 g
Fosfato dipotásico	1 g

Citrato sódico	2g
Cloruro sódico	5 g
Agar base	15 g
Azul de bromo timol	0 08 g

4 Glucosa

Dextrosa	1 g
Agar base	12 g
Rojo fenol	0 01 g

5 Manitol

6 Sorbitol

7 Rhamnosa

Estos ultimos tres azucares se preparan
de igual manera que la glucosa

TINTE UTILIZADO PARA LA IDENTIFICACION

PRESUNTIVA DE *RHODOCOCCLUS*

1 Kinyoun modificado

Se preparan 3 reactivos

a) Fuchsin modificada de Kinyoun

Fuchsin basica	4 g
Fenol fundido	8 ml
Alcohol etilico 95%	20 ml
Agua destilada	100ml

Disolver la fuchsina en el alcohol y luego
 adicionar el agua lentamente con agitación
 Fundir cristales de fenol en baño de agua
 caliente a 56°C medir con pipeta 8 ml y
 adicionar a la fuchsina

b) Alcohol ácido (decolorante)

Ácido clorhídrico concentrado	3 ml
Alcohol etílico al 95%	95 ml

c) Azul de metileno (colorante de contraste)

Cloruro de azul de metileno	0.3 g
Agua destilada	100 ml

**REACTIVOS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR
 DE *RHODOCOCCLUS***

TAE 50X (1L)

Tris Base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5M a pH 8	100 ml

Se lleva hasta un volumen de 1 L con agua
 estéril y se guarda a temperatura ambiente

TBE 10X (1L)

Tris Base	157.4 g
Ácido bórico	46.3 g
EDTA 0.5M pH 8	50 ml

Agua esteril 800 ml

Se ajusta el pH a 8.8 y se lleva hasta 1 L con agua esteril. Se guarda a temperatura ambiente.

SOLUCION 1X (TAE) PARA GEL DE AGAROSA UTILIZADO PARA CONCENTRACIONES Y AMPLIFICACIONES DE ADN

1. Tomar 2 ml de TAE 50X y adicionar a 98 ml de agua destilada para un total de 100 ml (TAE 1X)
2. Agregar los 100 ml de TAE 1X a 1g de agarosa normal

SOLUCION 1X (TBE) PARA GEL DE AGAROSA UTILIZADO PARA LAS ELECTROFORESIS DE LAS PCR RFLP

1. Tomar 200 ml de una solución de TBE 2X y agregar 200 ml de agua destilada (TBE 1X)
2. Agregar 200 ml de TBE 1X en 1.6 g de agarosa normal

BROMURO DE ETIDIO

1. Agregar 0.1g del polvo de etidio a 100 ml de agua destilada
2. Guardar en un envase oscuro apartado de la luz y en refrigeración

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA (5X)

Tris HCl	0 79 g
EDTA	1 46 g
Azul de bromofenol	0 1 g
SDS	0 5 g
Sacarosa	40 0 g

Agregar los ingredientes a 100 ml de agua destilada Guardar en congelación y separar en alícuotas de 1 0 ml

PROTEINASA K [100 µg/ml]

- 1 Se añaden 1000 ml a 100 mg de Proteinasa K y se disuelve
- 2 Se dispensan alícuotas de 1 ml en tubos de 1 5 ml
- 3 Se guardan congeladas
- 4 Una vez descongelada una alícuota no se puede volver a congelar se guarda refrigerada

LISOZIMA [2 mg/ml]

- 1 Se añaden 50 ml a 100 mg de lisozima
- 2 Se dispensan alícuotas de 1 ml en tubos de 1 5 ml
- 3 Se guardan congeladas Ir descongelando a medida que se utilizan las alícuotas

ETANOL AL 70% (1 L)

- 1 Se disuelven 700 ml de etanol absoluto en 200 ml de agua esteril
- 2 Se guarda en condiciones de congelación

NaCl 5M (1 L)

- 1 Se disuelven 292.2 g de NaCl en 800 ml de agua estéril
- 2 Se añade agua estéril hasta un volumen final de 1 L
- 3 Se autoclave y se guarda a temperatura ambiente